



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ação de antibióticos macrolídeos (azitromicina e espiramicina) sobre o perfil de produção de citocinas em linhagem de células trofoblásticas BeWo e mielomonocíticas THP-1 infectadas por *Toxoplasma gondii*

PRISCILA SILVA FRANCO

UBERLÂNDIA

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ação de antibióticos macrolídeos (azitromicina e espiramicina) sobre o perfil de produção de citocinas em linhagem de células trofoblásticas BeWo e mielomonocíticas THP-1 infectadas 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.

PRISCILA SILVA FRANCO

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eloisa Amália Vieira Ferro
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neide Maria da Silva

Uberlândia
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail coipa@ufu.br
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Priscila Silva Franco

“Ação de antibióticos macrolídeos (azitromicina e espiramicina) sobre o perfil de produção de citocinas em linhagem de células trofoblásticas BeWo e mielomonocíticas THP-1 infectadas por *Toxoplasma gondii*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 18 de março de 2011.

Prof. Dra. Sonia Maria Olini – IBILCE/UNESP

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva – ICBIM/UFU

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- F825a Franco, Priscila Silva, 1985-
Ação de antibióticos macrolídeos (azitromicina e espiramicina) sobre o perfil de produção de citocinas em linhagem de células trofoblásticas BeWo e mielomonocíticas THP-1 infectadas por *Toxoplasma gondii* [manuscrito] / Priscila Silva Franco. - 2011.
72 f. : il.
- Orientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro.
Co-orientadora: Neide Maria da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Toxoplasmose - Tratamento - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Azitromicina - Teses. 4. Espiramicina - Teses. I. Ferro, Eloísa Amália Vieira. II. Silva, Neide Maria da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.993.1-08

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À Deus, pela oportunidade de viver.

Aos meus pais Edriane e Marcelo por me concederem o dom da vida e serem meus exemplos de coragem e dedicação.

À minha irmã Polliana, pelo apoio e companhia.

Ao meu querido Henrique, pelo carinho e compreensão.

Obrigada por estarem ao meu lado.

Amo muito todos vocês!

Agradecimentos

À **Deus**, por me dar sabedoria e força nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, **Profª Dra. Eloisa**, pela confiança e ensinamentos. Obrigada por ter me acolhido desde o início da minha vida acadêmica e me proporcionar tantas conquistas.

À minha co-orientadora, **Profª Dra. Neide**, pelas sugestões e pela ajuda nos momentos das dúvidas.

À **Profª Dra. Deise** pela competência e disponibilidade em me ajudar.

Ao **Profª Dr. Olindo** e à **Profª Dra. Andréa** pela imensa ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

Aos meu avós, **Ziláh e Lázaro**, pelo carinho e dedicação.

Aos meus tios, **Éder e Elílian**, pelo incentivo aos estudos.

Aos meus tios e primos, pelo apoio e compreensão.

À minha prima, **Laís**, pelo apoio e amizade. Obrigada por ser meu ombro amigo.

À minha sogra, **Maria Helena**, pelo carinho e ajuda constante.

À **Angelica, Bellisa e Mariana**, pela imensa paciência, companheirismo e boa vontade em me ajudar em todos os momentos que passei na cultura de células. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos, **Débora, Henrique, Lourdes e Renato**, pela atenção e carinho que sempre tiveram comigo. Adoro vocês.

À **Mariana, Ester, Silas, Henrique e Marcelo**, companheiros de mestrado. O verdadeiro mérito não está em receber honras, mas sim em merecê-las.

À **Andressa, Loyane, Rosiane, Letícia, Pâmela, Mayara, Janice e Flávia** pela convivência e aprendizado.

À **Cristina** e ao **Marley** pela disponibilidade em me ajudar no laboratório de imunologia.

À **CAPES, FAPEMIG e CNPq**, pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a todos, que de alguma forma, me ajudaram a ser o que sou hoje e ter chegado até aqui.

“In vitro cultivation of protozoa is presently more an art than a science... To be successful in cultivating parasitic protozoa, or any cell or organism, one must have infinite patience, persistence and a willingness to devote countless hours... The cultivator must be observant, sensitive to the slightest alteration in behavior of the organisms and able to respond appropriately.”

Diamond et al., 1983

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.2 Ciclo biológico	12
1.3 Toxoplasmose	13
1.4 Toxoplasmose congênita	15
1.5 Resposta imune	16
1.6 Resposta imune na gestação	19
1.7 Tratamento da toxoplasmose	21
1.8 Linhagens celulares	23
1.8.1 Células trofoblásticas de coriocarcinoma humano (BeWo)	23
1.8.2 Células mielomonocíticas THP-1	24
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Cultura de células BeWo e THP-1	27
4.2 Manutenção da cepa RH de <i>T.gondii</i>	27
4.2.1 Manutenção <i>in vivo</i>	27
4.2.2 Manutenção <i>in vitro</i>	28
4.3 Antibióticos	28
4.4 Ensaio de MTT	28
4.5 Análise do índice de infecção e replicação intracelular de <i>T. gondii</i> sob influência dos diferentes tratamentos	29
4.6 Determinação de citocinas em células BeWo e THP-1	29
4.6.1 Infecção com <i>T. gondii</i> e tratamento das células BeWo e THP-1	29
4.6.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	30
4.6.3 Cytometric Bead Array (CBA)	30
4.7 Análise estatística	31
4.8 Normas de biosegurança	31

5. RESULTADOS	32
5.1 Viabilidade celular após tratamento com azitromicina e espiramicina.....	32
5.2 Infecção e replicação intracelular de T. gondii em célula BeWo e THP-1	32
5.3 Produção de MIF por células BeWo e THP-1 infectas com T. gondii e tratadas com azitromicina ou espiramicina.....	33
5.4 Produção de citocinas (Th1/Th2) por células BeWo infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina.....	34
5.5 Produção de citocinas (Th1/Th2) por células THP-1 infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina.....	35
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES.....	43
8. FIGURAS	44
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO I.....	72

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar uma variedade de hospedeiros, causando infecções graves em indivíduos imunocomprometidos e em mulheres durante a gestação. Os antibióticos macrolídeos, azitromicina e espiramicina, têm efeitos comprovados no controle da toxoplasmose. Células trofoblásticas da linhagem BeWo e células de linhagem mielomonocíticas THP-1 são utilizadas como modelo experimental na infecção por *T. gondii*. Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo verificar a ação desses antibióticos na modulação da produção de citocinas por células BeWo e THP-1 infectadas ou não por *T. gondii*. Inicialmente, as células foram tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina para a análise da viabilidade celular pelo método colorimétrico do tetrazólio de metiltiazol (MTT). Células BeWo apresentaram menor viabilidade em concentrações maiores que 400 µg/mL para ambas as drogas, enquanto as THP-1 apresentaram menor viabilidade em concentrações maiores que 200 µg/mL. O tratamento com as drogas diminuiu o parasitismo, bem como a replicação intracelular de *T. gondii* nas células BeWo e THP-1. A infecção por *T. gondii* promoveu aumento na produção do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) em células BeWo e essa produção foi maior em células infectadas e tratadas com azitromicina. Células BeWo e THP-1 infectadas e tratadas com as drogas apresentaram maior produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-4 e IL-5. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o tratamento de células BeWo e THP-1 com azitromicina ou espiramicina foi capaz de controlar a infecção e replicação de *T. gondii*. Além disso, o tratamento com essas drogas induziu uma resposta anti-inflamatória e alta produção de MIF, que são importantes fatores para o estabelecimento e manutenção da gestação.

Palavras-chave: Azitromicina, células BeWo, citocinas, *Toxoplasma gondii*, espiramicina

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects a wide range of hosts and infection cases are severe in immunocompromised individuals and during pregnancy. The macrolide antibiotics have proven effects in control of toxoplasmosis. BeWo trophoblast cell lineage and myelomonocytic cell line THP-1 are used as experimental models for infection by *T. gondii*. Therefore, this study aimed to verify the effect of azithromycin or spiramycin in the cytokine production modulation in infected or non-infected BeWo and THP-1 cells by *T. gondii*. First, the cells were treated with different concentrations of azithromycin or spiramycin to cell viability analysis using the colorimetric assay of thiazolyl blue tetrazole (MTT). BeWo cells showed lower viability in concentrations greater than 400 µg/mL for both drugs, while THP-1 cells showed less viability in concentrations greater than 200 µg/mL. The treatment with drugs decreased of parasitism, as well as intracellular replication of *T. gondii* in BeWo and THP-1 cells. *T. gondii* infection induced up-regulation of the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in BeWo cells and the production was enhanced in treated infected BeWo cell with azithromycin. Treated and infected BeWo and THP-1 cells increased anti-inflammatory cytokine IL-10, IL-4 and IL-5 production. In conclusion, the present study demonstrated that treatment of BeWo and THP-1 cells with azithromycin or spiramycin is able to control the infection and replication of *T. gondii*. In addition, the treatment with these drugs induce an anti-inflammatory immune response and high production of MIF that are important factors for establishment and maintenance of pregnancy.

Keywords: Azithromycin, BeWo cell, cytokines, *Toxoplasma gondii*, spiramycin

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e família Sarcocystidae (REY, 2001). A espécie foi descrita em dois países diferentes no ano de 1908, no Instituto Biológico de São Paulo por Splendore em coelhos, e no Instituto Pasteur de Tunis por Nicolle e Manceux no roedor africano *Ctenodactylus gondi*.

T. gondii é capaz de infectar aves e mamíferos, inclusive humanos, e ainda tem a capacidade de se multiplicar na maioria das células dos hospedeiros (DUBEY, 1993; LAVINE; ARRIZABALAGA, 2007), apresentando uma alta prevalência mundial e importância médica e veterinária (TENTER et al., 2000). No entanto, a infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, sendo que apenas aproximadamente 10% dos casos apresentam sintomas não-específicos que raramente precisam de tratamento (MONTROYA; LIESENFIELD, 2004; DUBEY; JONES, 2008).

Os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa apresentam características comuns, como a presença de um complexo apical composto por organelas peculiares, tais como roptrias, micronemas e conóide. As micronemas e roptrias são organelas secretoras responsáveis pela mobilidade do parasito, adesão e invasão da célula hospedeira (CARRUTHERS, 1999; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002).

T. gondii possui três formas evolutivas conhecidas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoíta (KAWAZOE, 2005). Os taquizoítas representam a forma de multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira (MONTROYA; LIESENFIELD, 2004). São vulneráveis aos fatores de defesa do hospedeiro e, por isso, estudados como alvos preferenciais para a escolha, ação e desenvolvimento de medicamentos (MCFADDEN et al, 2001; KIM; WEISS, 2004; RADKE et al, 2006). São vistos na fase aguda da infecção distribuídos pelo sistema circulatório e têm a capacidade de infectar vários tecidos (REMINGTON et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2008, TENTER, 2009).

Os bradizoítas representam as formas que pela pressão imposta pela resposta imune encontram-se dentro de cistos sob replicação lenta na fase crônica de infecção (LYONS et al, 2002). Tais cistos podem estar presentes em qualquer tecido do hospedeiro, porém são mais frequentes nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (MONTROYA; LIESENFIELD, 2004; NISHIKAWA et al., 2008; SKARIAH et al., 2010). Intacto, o cisto pode persistir no hospedeiro sem causar nenhum dano, representando reservatório da

infecção. A ruptura de elevado número de cistos é considerada a expressão da reativação da infecção com subsequente liberação dos bradizoítas, e sua diferenciação para taquizoítas, que proliferarão na vigência de imunossupressão (REMINGTON et al., 2001; ELSHEIKHA, 2008). Já esporozoítas (contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos), corresponde às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito encontrada no ambiente podendo contaminar água, solos e alimentos (AMENDOEIRA, 1995; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

As cepas de *T. gondii* isoladas em humanos e outros animais na Europa e América do Norte são classificadas em três linhagens genéticas (tipos I, II e III). Entretanto, existem ainda cepas “recombinantes”, que se assemelham às três principais linhagens genéticas, ou cepas “exóticas”, que apresentam perfil genético diferente das demais (HOWE; SIBLEY, 1995; BOOTHROYD; GRIGG, 2002). As cepas do tipo I (RH, BK e VEL) são virulentas em camundongos, podendo levar a morte desses animais durante a fase aguda da infecção, enquanto as cepas do tipo II (ME-49, M3) e III (VEG) são raramente fatais durante a fase aguda, mas desencadeiam diversas alterações histológicas nos hospedeiros durante a fase crônica (VALLOCHI et al., 2005; HOWE et al., 1997; HONORE et al., 2000). As cepas “exóticas” estão associadas a formas clínicas graves de toxoplasmose ocular em locais como a África e o Brasil (DUBEY et al., 2007; AJZENBERG et al., 2009).

1.2 Ciclo biológico

Apenas as espécies dos gêneros *Felix* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos de *T. gondii* e se contaminam ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início ao ciclo sexuada no epitélio intestinal desses animais. Quanto aos hospedeiros intermediários, o protozoário pode infectar as células de mamíferos e aves, já que estes animais desenvolvem apenas um ciclo tissular assexuada (REY, 2001; KAWAZOE, 2005).

Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, a parede do cisto é rompida por enzimas proteolíticas gástricas e bradizoítas são liberados, penetrando nas mucosas do estômago e/ou intestino delgado. Estes bradizoítas multiplicam-se assexuadamente por um processo denominado endondiogonia (merogonia), dando origem a merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo. Os merozoítos, então, darão origem aos gametas masculinos e femininos. O gameta feminino é fecundado pelo masculino e após a fertilização, a formação da parede do oocisto é iniciada em volta do gameta fertilizado, ocorre a liberação dos mesmos no lúmen intestinal através da ruptura das células epiteliais intestinais e eliminação nas fezes dos felídeos. Uma vez eliminados, os oocistos levam de 1 a 5 dias para amadurecerem e

tornarem-se infecciosos através da esporulação, quando as condições de temperatura e umidade são adequadas. Os oocistos esporulados possuem dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY et al., 1998; JEFFREY et al., 2005; MOURA et al., 2009).

Os hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) podem adquirir a infecção por *T. gondii* por meio da ingestão de oocistos maduros presentes no solo, água e alimentos; ingestão de cistos teciduais em carnes cruas ou mal cozidas; ingestão de taquizoítas a partir de líquidos orgânicos como leite, esperma e saliva; infecções congênitas; órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; JEFFREY et al., 2005; DUMÈTRE et al., 2008). A fase crônica tem início com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, quando a maioria dos parasitos torna-se encistada no interior das células (diferenciação em bradizoítas). Não havendo distúrbios no sistema imunológico, esta fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KAWAZOE, 2005).

1.3 Toxoplasmose

A toxoplasmose é a protozoonose causada por *T. gondii* e é uma das zoonoses com maior difusão mundial, com taxas de prevalência diferentes, dependendo da área geográfica considerada (ELSHEIKHA, 2008). A razão para esta diferença na prevalência da toxoplasmose no mundo é atribuída a vários fatores, tais como o consumo de carne crua ou mal cozida, condição socioeconômica, condições climáticas, hábitos higiênicos e culturais e fatores genéticos do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; BOYER et al., 2005; PETERSEN, 2007; ELSHEIKHA, 2008).

A doença é considerada um problema de saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos e em casos de infecção congênita. Excluindo tais ocasiões, a doença geralmente cursa de forma assintomática ou benigna em cerca de 90% dos casos (REY, 2001; JEFFREY et al., 2005; DUMÈTRE et al., 2008). Em escala mundial, estima-se que 500 milhões de pessoas estão infectadas, representando 10 a 30% da população mundial (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Fatores biológicos como gestação, predisposição genética, imunodeficiência e virulência da cepa do parasito, contribuem para os diferentes índices de prevalência da doença no mundo (ELSHEIKHA, 2008).

O curso da doença se dá em dois estágios: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda há predomínio de taquizoítas, que se multiplicam rapidamente e invadem novas células. Algumas manifestações clínicas como febre, dor de garganta, linfadenopatia, mialgia, astenia, cefaléia e coriorretinite podem ocorrer. Já na fase crônica, há o predomínio de cistos teciduais contendo

bradizoítas no seu interior, e a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito torna-se mais eficaz, devido à imunidade adaptativa. Na toxoplasmose, em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças auto-imunes) a manifestação da doença quase sempre ocorre como resultado da reativação de cistos pré-existentes. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, podendo levar o paciente a óbito (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Manifestações clínicas e gravidade da doença estão diretamente relacionadas com interações entre parasito e hospedeiro, o que inclui: quantidade e via de inóculo, virulência da cepa, imunidade, genótipo, idade e integridade de mucosas e barreiras epiteliais do hospedeiro (RONMAN et al., 2006). *Toxoplasma gondii* é capaz de infectar uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais e células do sistema fagocitário (JOINER; DUBREMETZ, 1993). A invasão celular é ativa e leva cerca de 15 a 20 segundos, em que envolve o processo de reconhecimento, adesão e mecanismos de defesa.

O processo de invasão das células hospedeiras depende de interações de moléculas presentes na superfície do parasito com moléculas presentes na membrana da célula hospedeira. Diferentes tipos de proteínas são utilizadas em cada etapa do processo, o qual resulta na formação de uma interface ligante íntima entre o parasito e a célula alvo (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

A rápida disseminação dos parasitos está vinculada com a capacidade destes em infectar células migratórias do sistema imune como monócitos, linfócitos e células dentríticas (CHANNON et al., 2000; LAMBERT et al., 2006). Por meio destas células, o parasito é capaz de disseminar-se por vários tecidos e atravessar barreiras biológicas como placenta, barreiras hemato-cefálica e a hemato-retiniana, alcançando sítios de imunoprivilegio (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Outra forma que auxilia a disseminação do parasito é a infecção de células migratórias, como os leucócitos, mecanismo denominado “Cavalo de Tróia”, em que a propagação do parasito acontece concomitantemente à migração das células infectadas (LAMBERT et al., 2006). Unno e colaboradores (2008) demonstraram que este é o principal mecanismo de disseminação utilizado por *T. gondii*, uma vez que taquizoítas extracelulares são imediatamente eliminados pela resposta imune inata no início da infecção. Na circulação sanguínea, a maioria dos leucócitos infectados por *T. gondii* abriga um único parasito, sugerindo que leucócitos infectados, incluindo monócitos, migram para compartimentos extra vasculares antes da proliferação dos parasitos (COURRET et al., 2006). Após a migração dos leucócitos, o parasito multiplica-se no interior de vacúolos parasitóforos e, quando este leucócito sofre lise, células subjacentes serão rapidamente infectadas,

especialmente aquelas que tiveram ligadas aos leucócitos infectados. Assim, mecanismos de adesão celular são importantes no processo de disseminação da infecção por *T. gondii* (PFAFF et al., 2005a).

Os monócitos são as principais células envolvidas na disseminação do parasito e subsequente estabelecimento da infecção placentária (BARRAGAN; HITZIGER, 2008; UNNO et al., 2010). Tais células expressam moléculas ligantes às moléculas de adesão presentes em células trofoblásticas, como LFA-1 que se liga à ICAM-1 e VLA-4 que se liga à VCAM-1 e ligantes para selectinas. Assim, os parasitos invadem os monócitos que, pela corrente sanguínea, chegam à placenta onde se aderem às células trofoblásticas e, conseqüentemente, facilita a passagem transplacentária do parasito (PFAFF et al., 2005b; BARRAGAN; HITZIGER, 2008; PFAFF et al., 2008).

1.4 Toxoplasmose congênita

A forma congênita da toxoplasmose ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação. Desta forma, taquizoítas alcançam a circulação e os tecidos fetais, o que determina a passagem vertical do parasito (JONES et al., 2001; KODJIKIAN, 2010). No entanto, a transmissão congênita da doença não é obrigatória, equivalendo de 20 a 50% dos casos de infecção aguda primo materna humana (JONES et al., 2001). A probabilidade de haver infecção fetal quando a primo infecção materna ocorre no período pré-concepção é de 1%; entretanto se a gestante adquire a infecção no primeiro ou segundo trimestre gestacional, a possibilidade da transmissão vertical está entre 10-20%, porém o comprometimento fetal é mais severo podendo ocasionar o aborto. Caso a infecção ocorra no terceiro trimestre a possibilidade da infecção fetal situa-se entre 60-90% mas o comprometimento fetal é menor (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Além da infecção toxoplásmica primária, pode ocorrer transmissão transplacentária do parasito por reativação da doença materna crônica causada por alguma disfunção imunológica (REMYINGTON et al., 2001; KODJIKIAN, 2010).

Algumas alterações e sinais fetais caracterizam uma infecção congênita, como microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardamento mental e psicomotor (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ELSHEIKHA, 2008; BLANCO-LAGO et al., 2010). Cerca de 70 a 90% dos recém nascidos são assintomáticos para a doença, porém estes podem apresentar seqüelas mais tardiamente. Aproximadamente 80% das crianças afetadas pela transmissão vertical do parasito desenvolvem problemas visuais ou de

aprendizagem na vida adulta (JONES et al., 2003; RORMAN et al., 2006; KODJIKIAN, 2010).

Testes sorológicos, especialmente os imunoenzimáticos, são os exames de rotina para o diagnóstico da doença. Recomenda-se a realização do perfil sorológico para toxoplasmose no início da gestação, com a repetição dos exames para detecção de anticorpos IgM específico para *T. gondii* durante todo o período gestacional (ASHUBURN et al., 1998; BOYER et al., 2005, PETERSEN, 2007). Outras técnicas como “*Western-Blot*”, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e uso de proteínas recombinantes de *T. gondii* em fluidos corporais e no líquido amniótico têm-se mostrado importantes para o diagnóstico da infecção (ANDRADE et al., 2001; ELSHEIKA, 2008; KOTRESHA; NOORDIN, 2010).

A prevenção da toxoplasmose é baseada por programas de educação e saúde pública, recomendando à população que evitem contato com materiais potencialmente contaminados, como carnes, frutas e verduras. No caso da forma congênita, além dos programas de educação e saúde pública, a prevenção consiste em tentar evitar a passagem vertical do parasito por meio de administração de quimioterápicos para gestantes, em que se evidenciou infecção aguda e realizar diagnóstico precoce, que permita a introdução de esquemas terapêuticos para prevenir ou minimizar os riscos de sequelas futuras para os recém-nascidos (REMINGTON et al., 2001; ELSHEIKA, 2008).

1.5 Resposta imune

A resposta imune à infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. A heterogeneidade de resposta imune pode ser explicada pela grande variabilidade genética. A capacidade de infectar diversos tecidos, como sistema nervoso e placenta permite a indução de respostas com aspectos inerentes à esses órgãos. O grau de complexidade se reflete na possibilidade de infecção recorrente com cepas do parasito com virulência variável (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

Como *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é considerada a mais relevante no mecanismo de regulação da infecção. Vários componentes da resposta imune inata como fatores do complemento, neutrófilos, citocinas e quimiocinas participam do mecanismo de defesa contra o parasito (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005; MILLER et al., 2009). Já na resposta imune adaptativa os linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, células “*natural killer*” (NK), células apresentadoras de antígenos (APC) como os macrófagos e células dendríticas,

além dos leucócitos polimorfonucleares constituem o principal mecanismo de defesa contra esse patógeno (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; SUZUKI, 2002; WILSON et al., 2010).

A infecção com *T. gondii* estimula uma reação imune do tipo Th1 com acentuada produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e interleucina-1 (IL-1) β . IFN- γ é uma potente citocina ativadora de macrófago, que quando ativados produzem óxido nítrico (NO) permitindo uma ação tóxica contra o parasito (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; MILLER et al., 2009). Como células apresentadoras de antígenos produzem altos níveis de IL-12 em resposta a alguns antígenos liberados por taquizoítas, essa interleucina estimula células NK a produzir e secretar altos níveis de IFN- γ , o qual induz a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ . Altos níveis de IFN- γ estimulam macrófagos e células dendríticas a liberarem mais IL-12, amplificando assim a resposta imune. A IL-12 estimula também a produção IFN- γ por linfócitos T CD8⁺. Além disso, essas células apresentam atividade citotóxica, o que leva à lise de células infectadas com conseqüente liberação de taquizoítas. Esses por sua vez, ficam acessíveis a outros mecanismos da resposta imune, tais como anticorpos, sistema complemento, macrófagos ativados e células NK (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005; MILLER et al., 2009).

A resposta imune pró-inflamatória, caracterizada por produção de citocinas de perfil Th1, é efetiva no controle de taquizoítas, entretanto, ela pode ser danosa ao hospedeiro, devido principalmente à alta produção de IFN- γ que lesa os tecidos infectados. Desse modo, é necessária a ação de mecanismos imunomoduladores para o estabelecimento de um balanço entre um perfil de resposta Th1 e Th2. Esse balanço é mediado por IL-10, que é produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. A IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T; em macrófagos ativados; na diferenciação de clones Th1 de células T e na produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. Estudos demonstraram que camundongos deficientes em IL-10 infectados por *T. gondii* não conseguem controlar a infecção e morrem durante a fase aguda, devido à acentuada resposta inflamatória que ocorre principalmente no fígado e no intestino delgado, em virtude da produção descontrolada de TNF- α e IFN- γ (GAZZINELLI et al., 1996; MILLER et al., 2009).

As células dendríticas medeiam diversas funções biológicas incluindo a apresentação de antígenos, fagocitose, produção e secreção de citocinas, desempenhando papel crucial no desenvolvimento inicial da resposta imune adaptativa (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; LAMBERT et al., 2006).

Adicionalmente, a imunidade das mucosas também é importante no controle parasitário. À medida que *T. gondii* invade as células epiteliais intestinais, ocorre uma mudança na arquitetura das mesmas e um excessivo influxo de células inflamatórias para a lâmina própria, o que pode ocasionar necrose nesta região, sendo os linfócitos TCD4⁺ as principais células envolvidas neste processo (LIESENFELD et al., 1996; JU et al., 2009). Além disso, a infecção por *T. gondii* é capaz de ativar células NK e macrófagos, que são importantes na fase inicial da resposta ao parasito. Por mecanismos citotóxicos, diretos e indiretos, estas células atuam na inibição da proliferação parasitária, dando início a uma resposta imune específica contra o patógeno por meio da apresentação de seus antígenos (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; YAP et al., 2006).

Os linfócitos TCD8⁺ têm papel importante na proteção contra o parasito. São chamadas células T citotóxicas (CTL), uma vez que possuem grânulos citotóxicos, que são liberados na célula alvo, causando a sua lise. Os mastócitos também exercem grande importância na proteção contra *T. gondii*, pois liberam histaminas, proteases, ácido aracdônico e várias citocinas como IL-1, IL-3, IL-4 dentre outras, além de TNF- α . Estas citocinas são sintetizadas, ou algumas já estão estocadas, para serem liberadas imediatamente ou secretadas pelos mastócitos cerca de uma hora após o contato com o antígeno (FERREIRA et al., 2004; WILSON et al., 2010).

Os anticorpos desempenham um papel secundário no controle da infecção por *T. gondii*, no entanto são importantes no estabelecimento de diagnóstico sorológico para a doença (GROSS et al., 2004; PETERSEN, 2007). Anticorpos IgM podem ser encontrados após 7 dias de infecção, alcançando um título máximo em poucas semanas e declinando gradualmente. A infecção via oral, em alguns hospedeiros, pode induzir a formação de anticorpos IgA (KAWAZOE, 2000). Anticorpos IgG geralmente aparecem uma a duas semanas após a infecção alcançando títulos máximos em seis semanas, podendo declinar em alguns meses ou anos, com títulos baixos permanecendo por toda a vida (SHARMA, 1990).

A avaliação sorológica do tempo de vigência da infecção toxoplásmica tem fundamental importância como apoio para o diagnóstico de infecções recentes, pois é nesta fase que ocorrem eventuais manifestações clínicas da forma aguda, como também há possibilidade da transmissão congênita da infecção (CAMARGO et al., 1991; KAWAZOE, 2000). O diagnóstico da toxoplasmose durante o período gestacional é realizado pelos testes ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) de captura, ELISA-avidez e ISAGA (*Immunosorbent Agglutination Assay*), cuja sensibilidade atinge até 95%. Na presença de IgM

específica na primeira triagem da gestante, acompanhada da presença de IgG, tem-se a dificuldade na determinação da época provável da infecção materna e se o tratamento é ou não recomendável. Recomenda-se a realização do perfil sorológico para toxoplasmose no início da gestação, com a repetição dos exames durante todo o período gestacional (ASHUBURN et al., 1998; BOYER et al., 2005; PETERSEN, 2007).

1.6 Resposta imune na gestação

Durante a gestação as funções fisiológicas maternas são alteradas e o sistema imune normalmente apresenta um estado de tolerância aos antígenos fetais (ZENCLUSSEN, 2006). Muitos hormônios, mais notavelmente estrógenos e progesterona, estão amplamente aumentados e esta condição gera alterações no balanço de citocinas de perfil Th1/Th2. Assim, há uma tendência à conversão para o perfil Th2, com produção de citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , as quais são sintetizadas na interface materno-fetal, principalmente por células da decídua e da placenta fetal em todo o período gestacional (ROBERTS et al., 2001; MILLER et al., 2009; DENNEY et al., 2010). Entretanto, a presença de citocinas do perfil Th2 não exclui a produção de citocinas Th1 no microambiente placentário. Células trofoblásticas no primeiro trimestre de gestação produzem IFNs, IL-1 α e IL-1 β e um desequilíbrio na síntese ou secreção dessas citocinas pode causar a interrupção da gestação.

O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) atua também como citocina, sendo conhecido como regulador chave da imunidade inata e adquirida, importante na indução da resposta inflamatória a vírus e bactérias (BERNHAGEN et al., 1993; CALANDRA, et al., 1995) e tem a propriedade de ativar macrófagos e promover a morte de parasitos intracelulares (BERNHAGEN et al., 1998). MIF é produzido por diferentes tipos celulares, tais como linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e basófilos (LUE et al., 2002) e tem capacidade de sobrepor o efeito imunossupressivo de hormônios glicocorticóides na expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (CALANDRA et al., 1995). MIF exerce funções inflamatórias contra organismos protozoários tais como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *T. gondii* (SATOSKAR et al., 2001; REYES et al., 2006; FLORES et al., 2008; FERRO et al., 2008). Isto se deve a capacidade de inibir a migração randômica de macrófagos sugerindo que estes se acumulem no local de atuação (BERNHAGEN et al., 1998). Assim, nível elevado de MIF pode ser patogênico por promover uma resposta inflamatória excessiva. Entretanto, em

concentrações adequadas parece promover uma resposta inflamatória potente capaz de promover proteção contra doença grave para assegurar uma rápida e eficiente eliminação de parasitos (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002). Recentemente foi demonstrado que explantes placentários regulam positivamente a produção de MIF em resposta à estimulação com antígeno solúvel de *T. gondii* – STAg, sugerindo potencial atividade de MIF contra infecção por *T. gondii* nestes tecidos placentários (FERRO et al., 2008). Além disso, foi também demonstrado que MIF é fundamental na resistência contra *T. gondii* uma vez que camundongos MIF^{-/-} apresentam maior suscetibilidade à infecção por estes parasitos (FLORES et al., 2008).

A complexa rede de sinalização por meio de citocinas na interface materno-fetal adquire papel crucial durante infecções parasitárias. Qualquer desequilíbrio do balanço imunológico pode potencializar a produção de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, como TNF α , IFN- γ e IL-2 que são prejudiciais ao feto, podendo levar ao aborto (RAGHUPATHY, 2001; DAHER et al., 2004). Uma vez que o sistema imunológico materno produz citocinas antiinflamatórias para evitar a rejeição ao feto, há um potencial aumento da susceptibilidade à infecções parasitárias (ROBERTS et al., 2001). A maior susceptibilidade de gestantes à toxoplasmose pode estar relacionada à maior produção de citocinas antiinflamatórias, que são mais expressas durante a gestação. Neste caso, observa-se uma situação de “imunossupressão”, pois hormônios como estrógeno e progesterona modulam a reatividade das células T e a produção de citocinas (ROBERTS et al., 2001; VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2009). A produção de elevados níveis de glicocorticóides, tais como cortisol (hormônio imunossupressivo encontrado em quantidades elevadas em mulheres grávidas) pode suprimir tanto INF- γ quanto a ativação de mediadores de TNF- α , o que implica em reduzida ativação da atividade fagocítica de macrófagos (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002). Assim, a influência hormonal no sistema imunológico com a produção de citocinas antiinflamatórias para evitar a rejeição ao feto, acaba influenciando a susceptibilidade à infecção parasitária, e consequentemente, o risco de infecção placentária e transmissão congênita (SHIRAHATA et al., 1992; ABOU-BACAR et al., 2004). Entretanto, pode haver uma maior expressão de citocinas tipo Th1 devido à carga parasitária e virulência da cepa, o que pode ser prejudicial ao feto, muitas vezes acarretando aborto. Assim, a existências destas duas situações (gestação/infecção) impõem ao organismo materno adaptações que devem convergir para um padrão de resposta que leve em conta a existência de uma gestação saudável e a gravidade da infecção (ABOU-BACAR et al., 2004).

1.7 Tratamento da toxoplasmose

Geralmente a toxoplasmose ocasiona infecções brandas e até imperceptíveis em pacientes imunocompetentes em que não se recomenda o tratamento da doença. Contudo, quando a infecção ocorre em pacientes imunocomprometidos e em gestantes primoinfectadas, o tratamento é indicado (JONES et al., 2001; RORMAN et al., 2006). O principal tratamento da toxoplasmose congênita é uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina associadas ao ácido folínico principalmente em casos de infecção fetal confirmada (RORMAN et al., 2006). A espiramicina é a droga de escolha para gestantes com infecção aguda (JONES et al., 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ELSHEIKHA, 2008). Outra droga em estudos para o tratamento da toxoplasmose congênita, testada apenas em murinos, é a azitromicina, a qual apresenta atividade inibitória prolongada sobre a replicação intracelular de taquizoítas (GILMAN, 1997; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; TORKILDSEN et al., 2008; COSTA et al., 2009).

Espiramicina e azitromicina são antibióticos pertencentes ao grupo dos macrolídeos, que são compostos caracterizados por um anel de lactona macrocíclico que se liga a diferentes açúcares (REMINGTON et al., 2001; KATZUNG, 2006). Os macrolídeos pertencem a uma classe de antibióticos de amplo espectro que são usadas no tratamento de infecções bacterianas e parasitos intracelulares, como *T.gondii* (REMINGTON et al., 2001; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

A espiramicina apresenta 16 átomos de carbono e a azitromicina 15 átomos de carbono no anel. O alvo da ação de antibióticos macrolídeos é o ribossomo do parasito. Duas regiões do ribossomo são críticas para a síntese de proteínas: o centro decodificador na subunidade 30S que garante que apenas os tRNA portadores de anticódons que se pareiam com o códon (chamados de RNA *cognatos*) sejam aceitos no sítio A e o centro de peptidil transferase na subunidade 50S, onde os tRNA *cognatos* se associam para a formação da ligação peptídica. Os macrolídeos atuam inibindo a síntese protéica do parasito pela ligação do fármaco à subunidade maior 50S do ribossomo. A presença do antibiótico neste local impede a formação dos peptídeos, resultando na inibição da tradução (BRISSON-NOËL, 1988; RUBINSTEIN; KELLER, 1998; MANKIN, 2008).

Além de possuir mecanismos que atuam diretamente no parasito, estudos recentes sugerem que os macrolídeos possuem propriedades anti-inflamatórias (RUBIN, 2004; FRIEDLANDER; ALBERT, 2010), o que pode influenciar na resposta imune, principalmente em infecções parasitárias. Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram o efeito modulador dos macrolídeos no sistema imunológico. Estas drogas influenciam a produção de citocinas,

mostrando um efeito negativo sobre a resposta pró-inflamatória. Além disso, a maioria das células envolvidas na resposta imune são, de uma forma ou de outra, influenciadas quando os antibióticos macrolídeos são administrados (FRIEDLANDER; ALBERT, 2010).

A espiramicina tem a propriedade de alcançar altas concentrações nos tecidos, portanto é de grande importância na prevenção da transmissão de *T. gondii* através da placenta (GAGNE, 2001). A espiramicina não atravessa a barreira placentária, contudo é capaz de retardar a transmissão do parasito, promovendo redução na severidade da infecção fetal (REMINGTON et al., 2001). É utilizada em muitos países da Europa especialmente na França assim como na Ásia e América do Sul (RORMAN et al., 2006). Por ser um antibiótico do grupo dos macrolídeos, possui espectro antibactericida comparável à eritromicina e ativo contra *T. gondii* (REMINGTON et al., 2001).

A azitromicina apresenta amplo espectro de ação, sua difusão tecidual é mais rápida e mais elevada e sua meia-vida biológica é mais prolongada do que a de outros macrolídeos. Além disso, inova na possibilidade de administração única ao dia, resistência à degradação ácida do estômago, redução dos efeitos colaterais gástricos e na ampliação das propriedades terapêuticas (KATZUNG, 2006; PETROPOULOS et al., 2009). A azitromicina é indicada no tratamento de infecções respiratórias e dermatológicas causadas por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, doenças urogenitais, além de organismos como: *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Pneumocystis carinii* e também estudos comprovam sua efetividade em alguns protozoários como *Leishmania* sp e para *T. gondii* (BRAZ et al., 1999; KATZUNG, 2006; SINAGRA et al., 2007; LOPES et al., 2007).

Estudos *in vitro* realizado por Chamberland e colaboradores (1991) demonstraram comparativamente a atividade de treze macrolídeos contra *T. gondii*. Os resultados mostraram que a eritromicina e azitromicina foram as drogas que apresentaram melhores resultados contra o parasito. Além disso, neste mesmo estudo a azitromicina foi o único macrolídeo com ação prolongada contra *T. gondii* e capaz de inibir a replicação intracelular de taquizoítas. Em modelos animais, estudos utilizando o modelo experimental *Calomys callosus* demonstraram a eficiência do tratamento com azitromicina. Lopes e colaboradores (2009) observaram que o tratamento com a azitromicina em fêmeas gestantes e infectadas com *T. gondii* foi capaz de reduzir o número de cistos cerebrais do parasito nas mães e impedir a transmissão do mesmo para a região ocular dos fetos. Já Costa e colaboradores (2009), demonstraram que o tratamento com azitromicina a partir do quarto dia de gestação foi capaz de evitar a

transmissão vertical de *T. gondii*. Desta forma, azitromicina pode ser uma droga alternativa para o tratamento da infecção congênita por *T. gondii*.

Apesar da existência do tratamento para a toxoplasmose congênita há trinta anos, não se sabe se o tratamento pré-natal é realmente eficaz, ou ainda qual o real mecanismo de ação dos fármacos nas mulheres e nos fetos a estes submetidos (PINARD et al., 2003; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; ELSHEIKHA, 2008). Os medicamentos atualmente preconizados, como a espiramicina e a combinação de sulfadiazina e pirimetamina são capazes de controlar a infecção por *T. gondii*, porém o tratamento é pouco tolerado pelos pacientes devido seus efeitos colaterais. Além disso, estes medicamentos são pouco eficazes na eliminação do parasito na fase crônica da infecção e a resistência a algumas dessas drogas é observada (BAATZ et al, 2006).

1.8 Linhagens celulares

1.8.1 Células trofoblásticas de coriocarcinoma humano (BeWo)

Células BeWo foram isoladas a partir de um coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey (PATTILLO; GEY, 1968). Esta linhagem celular conservou muitas das propriedades de células trofoblásticas normais tais como, secreção hormonal - gonadotrofina coriônica humana; hormônio lactogênio placentário (BAHN et al., 1981); propriedade de adesão à células epiteliais do endométrio (LI et al., 2002). Além disso, secretam citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 (BENNETT et al., 1997) e fatores de crescimento. Apresentam ainda propriedades morfológicas e marcadores bioquímicos comuns ao trofoblasto humano (VAN DER ENDE et al., 1990).

Vários estudos são realizados na tentativa de estabelecer o papel de células trofoblásticas na modulação do perfil imunológico e transmigração placentária durante a gestação na presença de *T. gondii*. A utilização da linhagem celular de coriocarcinoma humano BeWo tem se mostrado um excelente modelo para esses estudos (BARRAGAN; SIBLEY, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008).

Um estudo comparativo mostrou que *T. gondii* se multiplica mais lentamente em células BeWo do que em fibroblastos. Além disso, também foi observado que a replicação do parasito não foi afetada quando tratadas com a combinação de IFN- γ e TNF- α , o que foi associada à falta de indução da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase por estas citocinas (PFAFF et al., 2005a). Já o estudo comparando células trofoblástica BeWo e células epiteliais do cérvix uterino humano (HeLa), demonstrou que as células BeWo são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*, uma vez que este tipo celular não controla a replicação do parasito,

mesmo após administração exógena de IFN- γ , enquanto células HeLa mostraram-se dependentes de IFN- γ para conter o crescimento parasitário (OLIVEIRA et al., 2006).

1.8.2 Células mielomonocíticas THP-1

Células THP-1 (human acute monocytic leukemia cell line) é uma linhagem celular mielomonocítica derivada do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda (TSUCHIYA et al, 1980). Esta linhagem apresenta propriedades semelhantes à macrófagos derivados de monócitos humanos produzindo IL-1 e expressam receptores para C3b e Fc, 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).

Morfologicamente, estas células apresentam um aspecto arredondado e, em cultura, não são aderentes. As células THP-1 são utilizadas em cultura como substitutas de monócitos do sangue, por se dividirem facilmente e se manterem em cultura por longos períodos (TSUCHIYA et al, 1980). Esta linhagem celular é permissiva ao crescimento de *T. gondii in vitro*, o que permite realizar estudos que avaliam a disseminação e a capacidade deste parasito em atravessar barreiras biológicas (CHANNON et al., 2000; BARRAGA; SIBLEY, 2003). Neste sentido, células THP-1 são utilizadas em estudos que avaliam a interação de monócitos e células trofoblásticas utilizando *T. gondii*, simulando assim a transmissão vertical deste parasito (PFAFF et al, 2005b).

Pfaff e colaboradores (2008) demonstraram que células THP-1, infectadas com *T. gondii*, possuem menor capacidade de adesão à fibroblasto comparada com células não infectadas. Por outro lado, quando são estimuladas com IFN- γ e TNF- α , as células THP-1 apresentaram maior capacidade de adesão. É provável que em infecções agudas, tanto o parasito, quanto a presença de citocinas no microambiente da infecção podem modular mecanismos de adesão celular.

2. JUSTIFICATIVA

A passagem transplacentária é uma das maiores complicações causadas pela infecção por *T. gondii*. A elucidação dos mecanismos que controlam a passagem vertical do parasito é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Os macrolídeos espiramicina e azitromicina, além de possuírem mecanismos que atuam diretamente no parasito, possuem propriedade anti-inflamatória, o que pode influenciar tanto na resposta imune contra a infecção por *T. gondii* como na manutenção da gestação.

Um sistema *in vitro* possibilita estudos relacionados ao transporte placentário e moléculas envolvidas, efeitos de drogas sobre a população celular e o comportamento de patógenos nas células. Assim, o presente estudo se justifica pela possibilidade de analisar, *in vitro*, os efeitos dos fármacos espiramicina ou azitromicina em células BeWo e THP-1. A análise dos efeitos nestes tipos celulares é de grande importância, pois constituem um modelo que simula o mecanismo de transmissão vertical da toxoplasmose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos das drogas azitromicina ou espiramicina em células BeWo e THP-1 infectadas ou não com *T. gondii*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do tratamento com azitromicina ou espiramicina em células BeWo e THP-1;
- Determinar a influência de azitromicina ou espiramicina no índice de infecção e proliferação de *T. gondii* em células BeWo e THP-1;
- Avaliar a produção de MIF em linhagem de células BeWo e THP-1 tratadas com azitromicina ou espiramicina e/ou infectadas por *T. gondii*;
- Avaliar a produção de citocinas do perfil Th1/Th2 em linhagem de células BeWo e THP-1 tratadas com azitromicina ou espiramicina e/ou infectadas por *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células BeWo e THP-1

Células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) e mielomonócitos humanos da linhagem celular THP1 foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, USA) e mantidas em cultura no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU) (Anexo 1).

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² (TPP®, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) contendo meio de cultura composto por meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, antibióticos (10.000U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Cultilab, Brasil ou Sigma Chemical CO., Brasil) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO₂, a 37° C.

O repique das células foi realizado a cada três dias. Frascos contendo células BeWo receberam novo meio de cultura e com auxílio de *cells scrapers* (Ciencor Scientific, Brasil), as células foram retiradas e transferidas para tubos de 15 ml. Células THP-1 em suspensão foram retiradas do frasco de cultura e transferidas para tubos de 15 mL. Em seguida, foram centrifugadas a 720 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura com soro e distribuído em novos frascos de cultura de 25 cm² contendo 4 mL de meio de cultura, seguindo-se incubação a 37° C e 5% de CO₂.

4.2. Manutenção da cepa RH de *T.gondii*

4.2.1 Manutenção *in vivo*

A cepa RH de *T. gondii* foi mantida primariamente na cavidade peritoneal de camundongos Swiss do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia. Foi realizada inoculação intraperitoneal nos camundongos, por meio de passagens seriadas com intervalos de 48-72 horas de inóculo com aproximadamente 10⁶ taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal dos camundongos previamente infectados (MINEO et al., 1980).

4.2.2. Manutenção *in vitro*

Os exsudatos peritoniais de camundongos previamente infectados foram obtidos por meio de lavagens da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS) estéril pH: 7,2 e, em seguida, as suspensões parasitárias foram centrifugadas a 720 x g por 5 minutos. Os taquizoítas resultantes na fração *pellet* foram ressuspensos em 0,5 mL de meio de cultura e inoculados em monocamadas de células BeWo (BARBOSA et al., 2008).

4.3 Antibióticos

Os antibióticos azitromicina (Biofarma, Uberlândia, Brasil) e espiramicina (Sigma Chemical Co.) em pó foram reconstituídas em água estéril a uma concentração de 3.000 µg/mL (solução estoque) pouco tempo antes dos procedimentos experimentais. A obtenção da solução de trabalho foi feita a partir da solução estoque pela adição do meio de cultura para obtenção das diferentes concentrações.

4.4 Ensaio de MTT

A viabilidade de células BeWo e THP-1 tratadas ou não com azitromicina ou espiramicina foi avaliada utilizando-se o ensaio calorimétrico de MTT, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983). Células BeWo e THP-1 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de 5×10^4 células /200 µl/poço e incubadas a 37° C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina (50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/mL) por mais 24 horas. Células não tratadas serviram como controles do experimento. Após o tratamento, as placas de cultura foram centrifugadas (720 x g por 10 minutos), os sobrenadantes foram removidos e 100 µL/poço de tetrazólio de metiltiazol (MTT, Sigma Chemical Co.) foram adicionado. As placas foram incubadas em condições de cultura e, após 3 horas, os poços contendo as células foram novamente centrifugados. Após centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e as partículas insolúveis de coloração roxa, (cristais de formazan) produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT, foram então solubilizadas pela adição de 100 µL/poço de 10% duodecil sulfato de sódio (SDS) a 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica (DO) foi determinada a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA) e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação aos controles (100%). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

4.5 Análise do índice de infecção e replicação intracelular de *T. gondii* sob influência dos diferentes tratamentos

Células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas redondas (13-mm) em placa de 24 poços e células THP-1 em placa de 96 poços na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, na proporção de 3 parasitos por célula BeWo ou THP-1, por mais 24 horas. Em seguida, as linhagens celulares foram tratadas por 24 h com as concentrações de 50, 100, 200 e 400 μ g/mL de azitromicina ou espiramicina. Como controle, os mesmos procedimentos foram realizados, porém na ausência dos tratamentos. As células BeWo foram lavadas em PBS, fixadas em formol 10% em PBS por 2 horas e coradas com azul de toluidina 1% por 30 segundos. As células THP-1 foram centrifugadas (720 x g, 10 minutos) e o *pellet* foi ressuspensão em 5 μ L de PBS. Foi realizado um esfregaço do *pellet* correspondente a cada condição testada e, após fixação com formol 10% em PBS por 30 minutos, foram corados com azul de toluidina por 30 segundos.

As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e as células foram quantificadas quanto à porcentagem de células infectadas a cada 200 células examinadas (índice de infecção) e quanto ao número total de parasitos intracelulares a cada 200 células infectadas examinadas (replicação intracelular do parasito).

4.6 Determinação de citocinas em células BeWo e THP-1

4.6.1 Infecção com *T. gondii* e tratamento das células BeWo e THP-1

Células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas redondas (13-mm) em placa de 24 poços e células THP-1 em placa de 96 poços na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, na proporção de 3 parasitos por célula BeWo ou THP-1. Após 24h, as células foram tratadas nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 μ g/mL de azitromicina ou espiramicina a 37 ° C e 5% de CO². Células não infectadas e não tratadas (controle) ou células infectadas e não tratadas (*T. gondii* – Tg controle) foram mantidas apenas em meio completo como controle. Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70 ° C para posterior dosagem de citocinas. Dois experimentos independentes foram realizadas em triplicata para cada condição.

4.6.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A concentração de MIF foi determinada por ensaio ELISA *sandwich* de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Brevemente, placas para ELISA com 96 poços de alta afinidade foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-MIF humano (R&D Systems, Abingdon, UK), “overnight” a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBS Tween 20 e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (Soro Albumina Bovina – BSA 1% e PBS) e incubados a temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem das placas, 50 µL das amostras foram adicionadas em triplicata e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente.

Paralelamente, curvas padrões de MIF foram realizadas em diluições duplas seriadas. As placas foram então lavadas e incubadas com anticorpo de cabra anti-MIF humano biotinizado (R&D Systems). Após novas lavagens, as placas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (Zymed, San Francisco, CA) por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A seguir adicionou-se 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (Zymed).

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 o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de sensibilidade foi 18 pg/mL. O coeficiente de variação intra-análise e inter-análise foram de 3.86 % e 9.14%, respectivamente.

4.6.3 Cytometric Bead Array (CBA)

As citocinas humanas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, IFN- γ and TNF- α) foram determinadas usando o kit Cytometric Bead ArrayTM (CBA; BD Biosciences, San Jose, CA). Brevemente, tubos contendo as amostras (sobrenadantes) foram misturadas com um mix de beads de captura para cada citocina. Após a mistura, foram adicionados os anticorpos anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-TNF- α humanos conjugados com ficoeritrina (PE) (BD Company, San Diego, CA) por 3 horas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Os tubos foram então centrifugados (720 x g por 7 minutos) e os sobrenadantes cuidadosamente aspirados e descartados. O *pellet* contendo as *beads* foi ressuspensão e as amostras foram analisadas no citômetro FACSCalibur BDTM (BD Company, San Diego, CA) e os dados obtidos foram analisados pelos softwares BDTM Cell Quest e CBA. Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência (MFI) para todas as citocinas analisadas.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). A comparação dos dados entre células infectadas/tratadas e infectadas/não tratadas (Tg controle) ou células não infectadas/não tratadas foi analisada pelo teste ANOVA (*one-way*) e pelo pós-teste de comparação de Dunnett. A comparação de dados entre os tratamentos de azitromicina e espiramicina foi analisado pelo teste t de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.8 Normas de biosegurança

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 (MINEO et al., 2005).

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular após tratamentos com as drogas

O número de células BeWo e THP-1 viáveis após o tratamento com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina foi avaliado por meio da análise calorimétrica do MTT (Figura 1). Observou-se que para as células BeWo tratadas com azitromicina, as concentrações de 600 e 800 µg/mL foram tóxicas em relação ao grupo controle (Figura 1A); As concentrações de 400, 600 e 800 µg/mL foram as que apresentaram maior citotoxicidade para células THP-1 (Figura 1B). Células BeWo tratadas com espiramicina, apenas a concentração de 800 µg/mL foi tóxica comparada com o grupo controle (Figura 1C). As concentrações de 600 e 800 µg/mL de espiramicina foram as mais tóxicas para células THP-1 (Figura 1D).

Baseado nesses resultados, os experimentos seguintes foram realizados com as concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL de azitromicina ou espiramicina para as células BeWo. Para as células THP-1, as mesmas concentrações foram utilizadas, exceto a concentração de 400 µg/mL de azitromicina ou espiramicina.

5.2 Infecção e replicação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e THP-1

Os índices de infecção e replicação intracelular do parasito em células BeWo e THP-1 foram determinados após tratamento celular com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina (Figura 2). Observamos menor índice de infecção quando as células BeWo foram tratadas com as drogas azitromicina ou espiramicina, principalmente nas concentrações mais altas (Figura 2A). Quando os tratamentos foram comparados, as células BeWo mostraram diminuição significativa do índice de infecção nas concentrações de 50 e 400 µg/mL, indicando menor quantidade de células infectadas quando foram tratadas com azitromicina (Figura 2A). Para as células THP-1, também foi observado diminuição significativa de células infectadas após tratamento com as drogas quando comparadas com o grupo controle (Figura 2C). Quando os tratamentos foram comparados, não observamos diferenças significativas (Figura 2C).

Quanto ao índice de replicação intracelular do parasito, observamos uma diminuição do número de parasitos nas células BeWo tratadas com todas as concentrações de azitromicina e nas concentrações de 200 e 400 µg/mL de espiramicina (Figura 2B). Quando os tratamentos foram comparados, observamos diferenças significativas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, indicando que houve diminuição no número de parasitos quando as células

BeWo foram tratadas com azitromicina nessas concentrações (Figura 2B). Em células THP-1, houve diminuição significativa do índice de replicação intracelular de *T. gondii* quando foram tratadas com as drogas (Figura 2D). Quando os tratamentos foram comparados, não observamos diferenças significativas (Figura 2D).

O efeito das drogas na replicação do parasito em células BeWo e THP-1 também foi representado pela taxa de inibição do crescimento de *T. gondii*, como mostra a Tabela 1 e 2. O tratamento das células BeWo com concentrações crescentes de azitromicina resultou em uma significativa inibição da replicação dos taquizoítas intracelulares de 13,0 a 40,7%. O efeito inibitório de espiramicina no crescimento de *T. gondii* foi observado nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, com significativa inibição de replicação do parasito de 23,9% e 31,4 % respectivamente (Tabela 1). Para as células THP-1, o tratamento com azitromicina resultou em uma significativa inibição da replicação dos taquizoítas intracelulares de 23,5 a 40,6% e para espiramicina de 24,4 a 29,2% (Tabela 2).

Fotomicrografias representativas de células BeWo e THP-1 infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina estão demonstradas nas figuras 3 e 4 respectivamente. Células BeWo e THP-1, tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina, apresentam menor número de parasitos intracelulares quando comparadas com células controles.

5.3 Produção de MIF por células BeWo e THP-1 infectas com *T. gondii* e tratadas com azitromicina ou espiramicina

A produção de MIF foi avaliada em sobrenadantes de cultura de células BeWo e THP-1 infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina (Figura 5). Células BeWo não infectadas e tratadas com as diferentes concentrações das drogas apresentaram aumento na produção de MIF nas concentrações de 100 e 200 µg/mL de azitromicina e em todas as concentrações de espiramicina, quando comparadas com o controle (Figura 5A). Quando os dois tratamentos foram comparados, observamos diferença significativa na concentração de 400 µg/mL, mostrando maior produção de MIF quando as células foram tratadas com 400 µg/mL de espiramicina (Figura 5A). Após a infecção, a produção de MIF por células BeWo aumentou significativamente quando tratadas com azitromicina, exceto para a concentração de 400 µg/mL e para todas as concentrações de espiramicina (Figura 5B). A produção de MIF por células BeWo infectadas e tratadas com azitromicina foi significativamente maior do que as células BeWo tratadas com espiramicina nas mesmas condições (Figura 5B). Além disso, a infecção com *T. gondii* aumentou a

produção de MIF em células BeWo infectas e não tratadas (Tg controle) comparado com células não infectadas e não tratadas (controle) (Figura 5C).

Em células THP-1 não infectadas e tratadas com as diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina não houve diferença significativa na produção de MIF quando comparadas com o controle ou entre os tratamentos (Figura 6A). Após a infecção, também não foi observado diferença significativa na produção de MIF quando foram comparadas com Tg controle (Figura 6B). Entretanto, observamos que a produção de MIF por células THP-1 infectadas foi significativamente maior do que as não infectadas (Figura 6C).

5.4 Produção de citocinas (Th1/Th2) por células BeWo infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina

O perfil de produção de citocinas foi avaliado em sobrenadante de células BeWo após infecção e tratamento com azitromicina ou espiramicina em diferentes concentrações (Figura 7). Células BeWo não infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina (50-400 µg/mL) não alteraram a produção de IFN- γ ou TNF- α quando comparadas com células controle (Figura 7A, C). Entretanto, o tratamento com 100 µg/mL e 200 µg/mL de azitromicina ou 400 µg/mL de espiramicina em células BeWo infectadas induziu um aumento significativo na produção de TNF- α comparado com células infectadas não tratadas (Tg controle) (Figura 7B). Quando os diferentes tratamentos foram comparados, observamos diferenças significativas nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, mostrando maior produção de TNF- α quando as células foram tratadas com 200 µg/mL de azitromicina ou 400 µg/mL espiramicina) (Figura 7B). Interessantemente, o tratamento com ambas as drogas, independente das concentrações testadas, diminuiu a produção de IFN- γ em células BeWo infectadas comparadas com células infectadas não tratadas (Tg controle) (Figura 7D). Quando os tratamentos foram comparados, não observamos diferenças significativas entre as concentrações de IFN- γ (Figura 7D). Além disso, não observamos alterações na produção de IL-2 em células BeWo tratadas com ambas as drogas comparada com o controle ou células BeWo infectadas e tratadas comparadas com Tg controle (dados não mostrados).

A avaliação de citocinas do perfil anti-inflamatórias revelou que a produção de IL-10 diminuiu em sobrenadantes de células BeWo não infectadas e tratadas com 200 e 400 µg/mL de azitromicina, assim como para todas as concentrações de espiramicina (Figura 7E). Após a infecção, observamos aumento na produção de IL-10 nas concentrações de 50 e 400 µg/mL de azitromicina e de 100 µg/mL de espiramicina comparado com Tg controle (Figura 7F).

Quando os tratamentos foram comparados, não foram observadas diferenças significativas (Figura 7F).

A produção de IL-4 não alterou quando células BeWo não infectadas foram tratadas com ambas as drogas (Figura 7G), mas quando células infectadas foram tratadas, observou-se aumento significativo na produção de IL-4 nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL de azitromicina e em todas as concentrações de tratamento com espiramicina (Figura 7H). Adicionalmente, verificou-se maior produção de IL-4 quando células BeWo infectadas foram tratadas com 50 µg/mL de espiramicina, comparada com o tratamento com azitromicina nesta mesma concentração. Nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IL-5 quando as células foram tratadas com as drogas, independentemente se as células eram infectadas ou não (dados não mostrados).

5.5 Produção de citocinas (Th1/Th2) por células THP-1 infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina

Em células THP-1 não infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina (50-200 µg/mL), a produção de TNF- α diminuiu significativamente para ambas as drogas quando comparadas com células controle (Figura 8A). Quando os diferentes tratamentos foram comparados, observou-se diferença significativa apenas para a concentração de 50 µg/mL, indicando que as células THP-1 tratadas com 50 µg/mL de azitromicina produziu menos TNF- α (Figura 8A). Entretanto, em células THP-1 infectadas, apenas na concentração de 50 µg/mL de azitromicina houve diminuição significativa da produção de TNF- α comparado com Tg controle (Figura 8B). Também, somente nesta concentração houve diferença significativa entre os tratamentos, mostrando menor produção de TNF- α quando as células foram tratadas com 50 µg/mL de azitromicina (Figura 8B).

A produção de IFN- γ por células THP-1 não infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina não mostrou alteração quando comparadas com células controle (Figura 8C). Entretanto, o tratamento das células THP-1 infectadas com ambas as drogas, independente das concentrações testadas, induziu um aumento significativo na produção de IFN- γ quando comparadas com Tg controle (Figura 8D). Quando os tratamentos foram comparados, apenas a concentração de 400 µg/mL apresentou diferença significativa, mostrando que nesta concentração a produção de IFN- γ por células THP-1 é maior quando são tratadas com espiramicina (Figura 8D).

Células THP-1 não infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina não mostraram alterações na produção de IL-2 quando comparadas com células controle (Figura 8E). Por outro lado, em células THP-1 infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina a produção desta citocina foi aumentada significativamente em ambos os tratamentos, independente da concentração (Figura 8F).

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, não houve diferenças significativas na produção de IL-10 por células THP-1 não infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina quando comparadas com o controle (Figura 8G). Entretanto, a produção de IL-10 por células THP-1 infectadas e tratadas aumentou significativamente em ambos os tratamentos quando comparados com Tg controle (Figura 8H). Quando os tratamentos foram comparados, observamos diferenças significativas em todas as concentrações, indicando que células THP-1 infectadas e tratadas com espiramicina são capazes de produzir mais IL-10 (Figura 8H). A produção de IL-4 e IL-5 não foram alteradas quando células THP-1 não infectadas foram tratadas com as drogas (Figura 8I;L). No entanto, quando as células infectadas foram tratadas, observamos aumento significativo de IL-4 e IL-5 em todas as concentrações de espiramicina (Figura 8J;M).

6. DISCUSSÃO

Embora a biologia e a fisiologia de *T. gondii* sejam amplamente investigadas, os medicamentos utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita possuem limitações devido aos seus efeitos colaterais, toxicidade elevada e resistência dos parasitos às drogas (ARAUJO et al., 1991; JEFFRIES; JOHNSON, 1996; SONDA; HEHL, 2006). Apesar disso, há poucos estudos sobre o tratamento da toxoplasmose e seus efeitos (SONDA; HEHL, 2006).

Macrolídeos pertencem a uma classe de antimicrobianos que representam cerca de 10-15% do mercado mundial de antibióticos orais (PERITI et al., 1993). Esses antibióticos desempenham um papel importante no tratamento de doenças infecciosas (MANKIN, 2008). A maioria dos estudos sobre o uso de antibióticos macrolídeos está relacionada com o seu uso clínico, interações medicamentosas, eficácia, efeitos adversos e toxicidade (VILUKSELA et al., 1996; BOSNAR, et al., 2005; KARABULUT et al., 2008; MILLROSE, et al., 2009). No presente estudo, foi avaliado o efeito dos macrolídeos azitromicina ou espiramicina, em células BeWo e THP-1, analisando a viabilidade celular, as taxas de infecção e replicação de *T. gondii* e produção de citocinas.

Existem poucos estudos comparando a toxicidade dos macrolídeos nos diferentes tipos celulares. Já foi demonstrado que alguns desses antibióticos apresentam atividade inibitória contra *T. gondii* apenas em concentrações que são tóxicas às células e, portanto, de uso desaconselhado (CHAMBERLAND et al., 1991). Desta forma, o estabelecimento das concentrações não tóxicas para a célula, mas ativas contra o parasito é de grande importância para possível indicação terapêutica da droga contra *T. gondii*.

A escolha das dosagens para o ensaio de citotoxicidade desse estudo foi realizada com base em estudos anteriores que utilizaram azitromicina e espiramicina no tratamento de outros tipos celulares e contra *T. gondii* (CHAMBERLAND et al., 1991; BOSNAR, et al., 2005; MILLROSE, et al., 2009). Assim, as concentrações experimentais para o ensaio de citotoxicidade para as células BeWo e THP-1 foram de 50, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL para ambas as drogas. Nas células BeWo, a azitromicina mostrou efeito citotóxico nas concentrações de 600 e 800 µg/mL e espiramicina apenas na concentração de 800 µg/mL. Para as células THP-1, as concentrações de 400, 600 e 800 µg/mL de azitromicina e de 600 e 800 µg/mL de espiramicina, foram as que apresentaram maior citotoxicidade.

Em um estudo utilizando linhagem de células do fígado humano, Viluksela e colaboradores (1996) compararam os efeitos hepatotóxicos dos macrolídeos. Eles demonstraram que a azitromicina foi o macrolídeo menos tóxico para as células hepáticas

humanas. Outro estudo utilizando linhagem de células endoteliais e fibroblastos, mostrou que a azitromicina teve efeito tóxico para células endoteliais em uma concentração acima de 40 µg/mL e para fibroblastos acima de 80 µg/mL (MILLROSE et al., 2009), o que demonstra que a citotoxicidade é relativa para cada tipo de célula.

Estudos prévios demonstraram que monócitos e macrófagos são capazes de concentrar intracelularmente esses medicamentos, e que baixas concentrações de azitromicina permanecem no soro e a maioria da droga concentra-se no interior das células, principalmente em macrófagos e neutrófilos (GORDAN; BLUMER, 2004; BOSNAR et al., 2005). Além disso, Vorbach e colaboradores (2002) analisaram, *in vitro*, o efeito da azitromicina na quantidade de ATP intracelular de células endoteliais do cordão umbilical humano para deduzir a condição do metabolismo celular. Após 60 minutos de incubação com 2000 µg/mL de azitromicina, ocorreu uma diminuição significativa das concentrações intracelulares de ATP. Assim, no presente trabalho, altas concentrações extracelulares de azitromicina ou espiramicina pode ter resultado em alta concentração intracelular que, por sua vez, tornaram-se tóxico para as células BeWo e THP-1. Entretanto, células BeWo e THP-1 mostraram-se viáveis mesmo em concentrações consideradas altas para outros tipos celulares.

Uma vez estabelecidas as concentrações menos tóxicas, investigamos o efeito do tratamento com azitromicina ou espiramicina na infecção das células BeWo e THP-1 por *T. gondii*. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com as drogas reduziu significativamente o número de células BeWo e THP-1 infectadas por *T. gondii*. Além disso, houve diminuição significativa na replicação intracelular do parasito. Quando os tratamentos foram comparados, observou-se diminuição significativa de células infectadas e parasitos intracelulares em células BeWo tratadas com azitromicina; já em células THP-1 não foi observado diferença significativa na comparação dos tratamentos com as drogas.

Sabe-se que azitromicina e espiramicina possuem atividades inibitórias contra *T. gondii* (GARIN; EYLES, 1958; JEFFRIES; JOHNSON 1996; DUNAY et al. 2004). O mecanismo de ação dos macrolídeos baseia-se na inibição da síntese de proteínas dos taquizoítas e bradizoítas do parasito (GRUJIC et al., 2004). Esses medicamentos inibem a síntese protéica do parasito pela ligação à subunidade maior do ribossomo o que resulta em uma inibição geral da tradução (KATZUNG, 2006; MANKIN, 2008). Chamberland e colaboradores (1991) mostraram que a azitromicina foi o macrolídeo que apresentou melhores resultados contra *T. gondii* em ensaios *in vitro*. Além disso, esta droga foi o único macrolídeo que demonstrou uma atividade inibitória prolongada contra o parasito. Assim, analisando em conjunto os dados de citotoxicidade e parasitismo, pode-se inferir que a diminuição do

número de células infectadas e da replicação intracelular do *T. gondii* pode ser atribuída ao fato dos macrolídeos serem capazes de se acumularem nas células BeWo e THP-1 e assim agirem diretamente contra os parasitos.

Antibióticos macrolídeos possuem efeitos imunomoduladores e são eficazes no tratamento da inflamação crônica das vias aéreas, além de sua atividade contra bactérias e parasitos, como por exemplo, o *T. gondii* (RUBIN, 2004; WIESNER; SEEGER, 2005). As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel central na iniciação e propagação das respostas imunes inflamatórias nas fases aguda e crônica (LILES; VAN VOORHIS, 1995). No entanto, a produção não regulada dessas citocinas, particularmente em excesso, pode tornar-se prejudicial ao organismo (SZARKA et al., 2010). Há evidências que demonstram que os antibióticos macrolídeos exercem efeitos anti-inflamatórios, por serem capazes de modular a cascata de citocinas e quimiocinas que induzem a iniciação e progressão da resposta imune (TAMAOKI et al., 2004; SZARKA et al., 2010). Uma vez que os antibióticos macrolídeos possuem efeitos imunomoduladores e exercem efeitos anti-inflamatórios, nós avaliamos a ação da azitromicina e da espiramicina na secreção das citocinas MIF, IL-10, IL-4, IL-5, IL-2, TNF- α e IFN- γ em células BeWo e THP-1.

MIF foi espontaneamente secretado pelas células BeWo, porém quando foram infectadas com *T. gondii* e tratadas com azitromicina, a produção de MIF foi significativamente maior do que as células tratadas com espiramicina.

MIF é uma citocina capaz de inibir a migração randômica de células mononucleares e é produzido por diferentes tipos celulares, incluindo trofoblasto e células uterinas (IETTA et al., 2007). Além disso, MIF é considerado um regulador importante das respostas imunes e inflamatórias, uma vez que é fundamental para defesa do hospedeiro contra vários parasitos intracelulares, incluindo o *T. gondii* (CHASAVANEYAKORN et al., 2002; REYES et al., 2006; FLORES et al., 2008), mantendo macrófagos ativados, aumentando assim o atividade microbida de respostas imunes inatas (CHASAVANEYAKORN et al., 2002; MCDEVITT et al., 2006; FLORES et al., 2008). Experimentos realizados com *Plasmodium* spp. mostraram que MIF, juntamente com o IFN- γ e/ou TNF- α , é fundamental na ativação dos macrófagos e eliminação dos parasitos (CHASAVANEYAKORN et al., 2002).

Em um estudo anterior, o nosso grupo demonstrou que a produção de MIF por explantes de vilos placentários humano está fortemente associada à estimulação por antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) (FERRO et al., 2008). Em outro estudo, células BeWo quando estimuladas com STAg e infectadas com *T. gondii* secretaram maior quantidade de MIF do que as células não-infectadas e não-tratadas (GOMES, 2008). Além disso, o bloqueio de MIF

endógeno resultou em maior susceptibilidade dessas células contra a infecção por *T. gondii* (GOMES, 2008). No presente estudo, nós mostramos que o tratamento com azitromicina foi capaz de aumentar a produção de MIF em células BeWo, que é uma importante citocina envolvida na resposta imune durante a gestação e que pode estar envolvido na resistência destas células à infecção por *T. gondii*.

Apesar dos monócitos serem capazes de produzir MIF (LUE et al., 2002), no presente estudo o tratamento com azitromicina ou espiramicina não alterou sua produção em células THP-1. Entretanto, a infecção por *T. gondii* aumentou significativamente a produção de MIF, mostrando que a infecção é um fator que estimula a produção desta citocina nessas células. Neste tipo celular, MIF atua aumentando a fagocitose, destruindo parasitos e células tumorais (POZZI; WEISER, 1992; ONODERA et al., 1997; JUNTTNER et al., 1998).

Durante a gestação, a defesa contra parasitos intracelulares como *T. gondii* representa um paradoxo devido à imunossupressão ou indução de tolerância aos tecidos fetais, sendo esses imprescindíveis para proteger o feto no útero, enquanto a resposta imune pró-inflamatória Th1 é necessária para mediar a defesa protetora contra parasitos (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; WILCZYNSKI, 2006; WITKIN et al., 2011). Neste contexto, o perfil de citocinas Th1/Th2 foi analisado no presente estudo.

Os resultados mostraram que células BeWo e THP-1 infectadas e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina polarizou a resposta imune para um perfil Th2, com aumento da produção de IL-4, IL-10 e IL-5. Entretanto, houve aumento na produção de TNF- α e diminuição de IFN- γ em células BeWo e aumento de IFN- γ e IL-2 em células THP-1.

Uma vez que IL-10 e IL-4 são citocinas que modulam diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, elas são importantes moduladores da resposta imune inata e adaptativa (BERKMAN et al., 1995; MOORE et al., 2001). Estudos prévios demonstraram que IL-4, IL-10 e IL-13 estão associadas às atividades biológicas contrárias às induzidas por IFN- γ em diversos tipos celulares (VASSE et al., 1996; SERPIER et al., 1997; GORDON et al., 2003). Muitos estudos têm mostrado que IL-10 antagoniza a expressão de vários genes e funções induzidas por IFN- γ em células de linhagem monocítica (BOGDAN et al., 1991; DE WAAL MALEFYT et al., 1993; D'ANDREA et al., 1993) e, recentemente algumas evidências sugerem que IL-10 é capaz de regular negativamente, tanto citocinas do perfil Th1, quanto do perfil Th2 (COUPER et al., 2008). Entretanto, outros estudos demonstraram que IL-4 e IL-13, mas não IL-10, pode inibir a expressão de genes induzidas por IFN- γ em fibroblastos humanos (VASSE et al., 1996; SERPIER et al., 1997; CHAVES et

al., 2001). Nossos dados mostraram aumento na produção de IL-10 e IL-4 em células BeWo infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina, sugerindo que essas citocinas estejam envolvidas no decréscimo da produção de IFN- γ .

IFN- γ foi inicialmente descrito como uma citocina produzida somente por linfócitos CD4⁺, linfócitos citotóxicos CD8⁺ e células NK (SCHRODER et al., 2004). No entanto, alguns trabalhos sugerem que as células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e as células dendríticas, também podem produzir IFN- γ (FRUCHT et al., 2001; CARVALHO-PINTO et al., 2002; ROBINSON et al., 2009). Em nosso estudo foi observado que células THP-1 produziram IFN- γ e que, diferentemente das células BeWo, a produção de IFN- γ aumentou significativamente quando as células infectadas foram tratadas com ambas as drogas. Apesar dos macrolídeos modularem uma resposta imune para o perfil Th2, IL-10 e IL-4 não interferiram na produção desta citocina em células THP-1. Este fato pode estar relacionado com a quantidade de IL-10 e IL-4 produzida, o que pode não ter sido suficiente para interferir na produção de IFN- γ nestas células.

Apesar de IFN- γ ser uma das citocinas mais importantes contra *T. gondii* (ABOUBACAR et al., 2004; PIAO et al., 2005; NOROSE et al., 2005), células BeWo são incapazes de controlar a replicação deste parasito, mesmo na presença de IFN- γ exógeno. Assim, foi sugerido que IFN- γ , pode não constituir a via que controla a sobrevivência do parasito em células BeWo (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008).

A predominância de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF e IL-2) produzidas em resposta à infecção por *T. gondii*, configura um quadro potencialmente prejudicial para a gestação, podendo levar ao aborto (RAGHUPATHY, 2001; DAHER et al., 2004). A presença de IFN- γ e TNF inibe a invasão das células trofoblásticas na mucosa uterina, por diminuir a produção de metaloproteínas e aumentar a apoptose (OTUN et al., 2011). No entanto, em um estudo realizado por Shiono e colaboradores (2007) foi demonstrado que TNF- α teve influência limitada no insucesso da gestação em murinos. TNF- α estimula a expressão indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima que catalisa a etapa inicial e limitante do catabolismo do triptofano, bem como a inibição da replicação de taquizoítas dentro das células de linhagem de fibroblastos humanos (CHAVES et al., 2001). Assim, nossos resultados sugerem que a diminuição dos níveis de IFN- γ induzido por IL-10 e IL-4 é uma situação favorável à gestação; já o aumento da produção de TNF- α é importante, uma vez que esta citocina tem ação contra *T. gondii* e não é tão prejudicial à gestação como IFN- γ .

Durante uma gestação normal, há um predomínio na produção de citocinas anti-inflamatórias, possivelmente para proteger o desenvolvimento do feto (DENNEY et al.,

2010). Neste sentido, IL-10 desempenha um papel importante na regulação do sistema imune durante a gestação (CHERNOFF et al., 1995; O’GARRA et al., 2007). Por outro lado, quando existe uma infecção, como por exemplo por *T. gondii*, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (moduladora), TGF- β e IL-6 podem potencializar a susceptibilidade da célula hospedeira para o parasito (TRIPP et al., 1993; MOORE et al., 2001).

Células BeWo mostraram-se suscetíveis à infecção por *T. gondii* quando citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β 1 estão envolvidas, sustentando a hipótese de que estas citocinas podem também facilitar a transmissão do parasito para os tecidos fetais (BARBOSA et al., 2008). No presente estudo, nós mostramos que o aumento da produção de IL-10 não influenciou no índice de infecção e replicação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e THP-1, indicando que a infecção e replicação do parasito foram controladas pela azitromicina e espiramicina e, possivelmente, por TNF- α por meio da indução da IDO.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o tratamento da toxoplasmose congênita com os macrolídeos azitromicina ou espiramicina não é prejudicial à gestação, pois induzem uma resposta anti-inflamatória e, ao mesmo tempo, agem diretamente contra o parasito. Já os monócitos, agindo como células de defesa, uma vez estimulados por IFN- γ , passam a secretar TNF- α , IL-1 e IL-12, ativando outras células do sistema imune, como as células NK uterinas estimulando a síntese de óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio, levando a uma primeira linha de defesa contra o parasito, antes do estabelecimento da resposta adaptativa dos linfócitos. Além disso, juntamente com as citocinas anti-inflamatórias, MIF atuaria na manutenção da imunidade placentária e participando da ativação de macrófagos, garantindo assim a continuidade da gestação e controle da infecção.

7. CONCLUSÕES

A análise sintética de nossos dados nos permite concluir que:

- Os macrolídeos, azitromicina e espiramicina, apresentam citotoxicidade para as células BeWo em concentrações maiores que 400µg/mL e para as células THP-1 em concentrações maiores que 200µg/mL;
- O tratamento das células BeWo e THP-1 com os macrolídeos é capaz de controlar a infecção e replicação de *T. gondii*;
- Azitromicina induz o aumento na produção de MIF em células BeWo infectadas;
- O tratamento com os macrolídeos é capaz de levar a uma resposta anti-inflamatória em células BeWo e THP-1 infectadas pelo aumento na produção de IL-10, IL-4 e IL-5.

8. FIGURAS

Figura 1

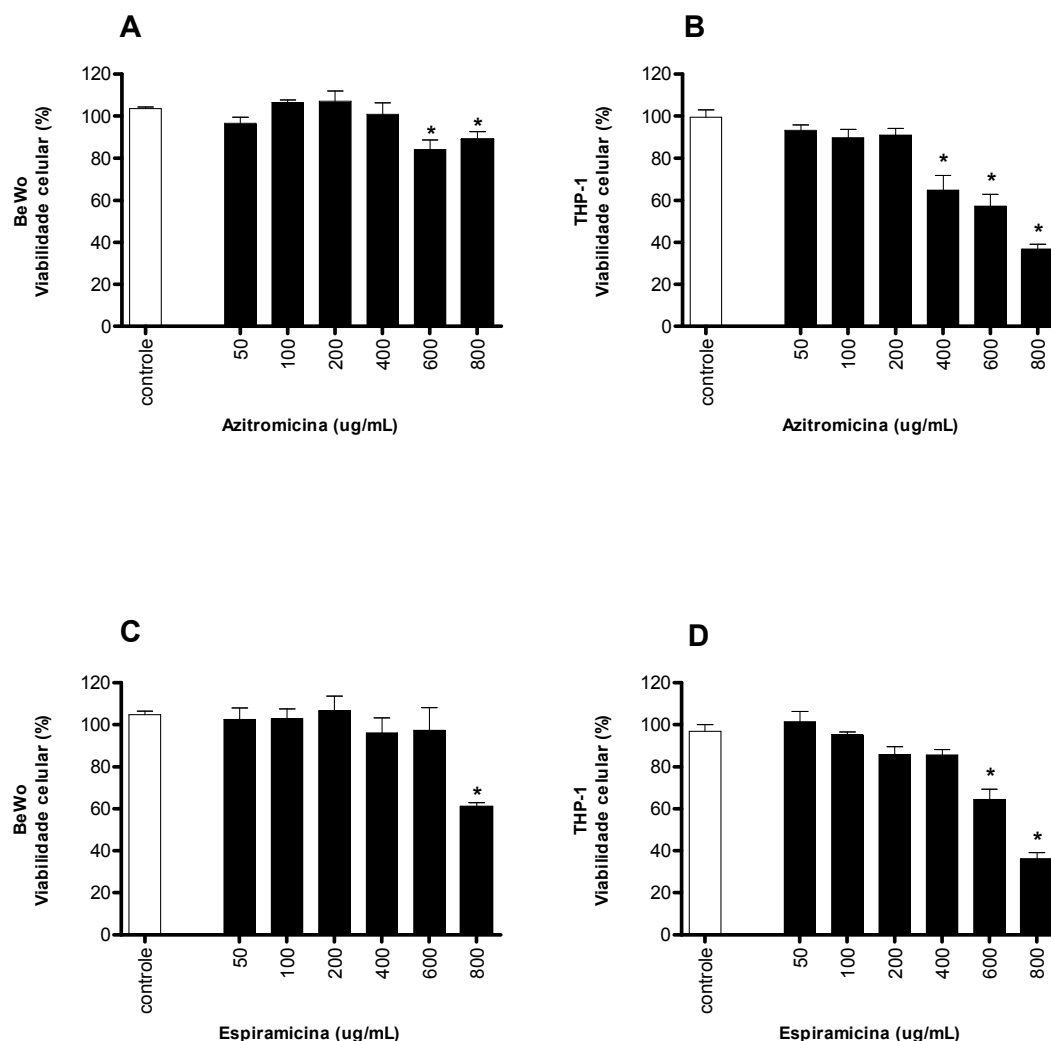


Figura 1. Viabilidade de células BeWo e THP-1 após tratamentos com azitromicina ou espiramicina. Células BeWo e THP-1 foram cultivadas em placas de 96 poços (5×10^4 céls/200µl/poço) a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com concentrações crescentes de azitromicina (**A, B**) ou espiramicina (**C, D**) (50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/mL) por 24 h. Células não tratadas serviram como controles do experimento. O número de células viáveis foi analisado utilizando o ensaio de MTT. Os dados estão expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle (média ± DP) e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre controle e diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina (Testes ANOVA e Dunnett, $p < 0,05$)

Figura 2

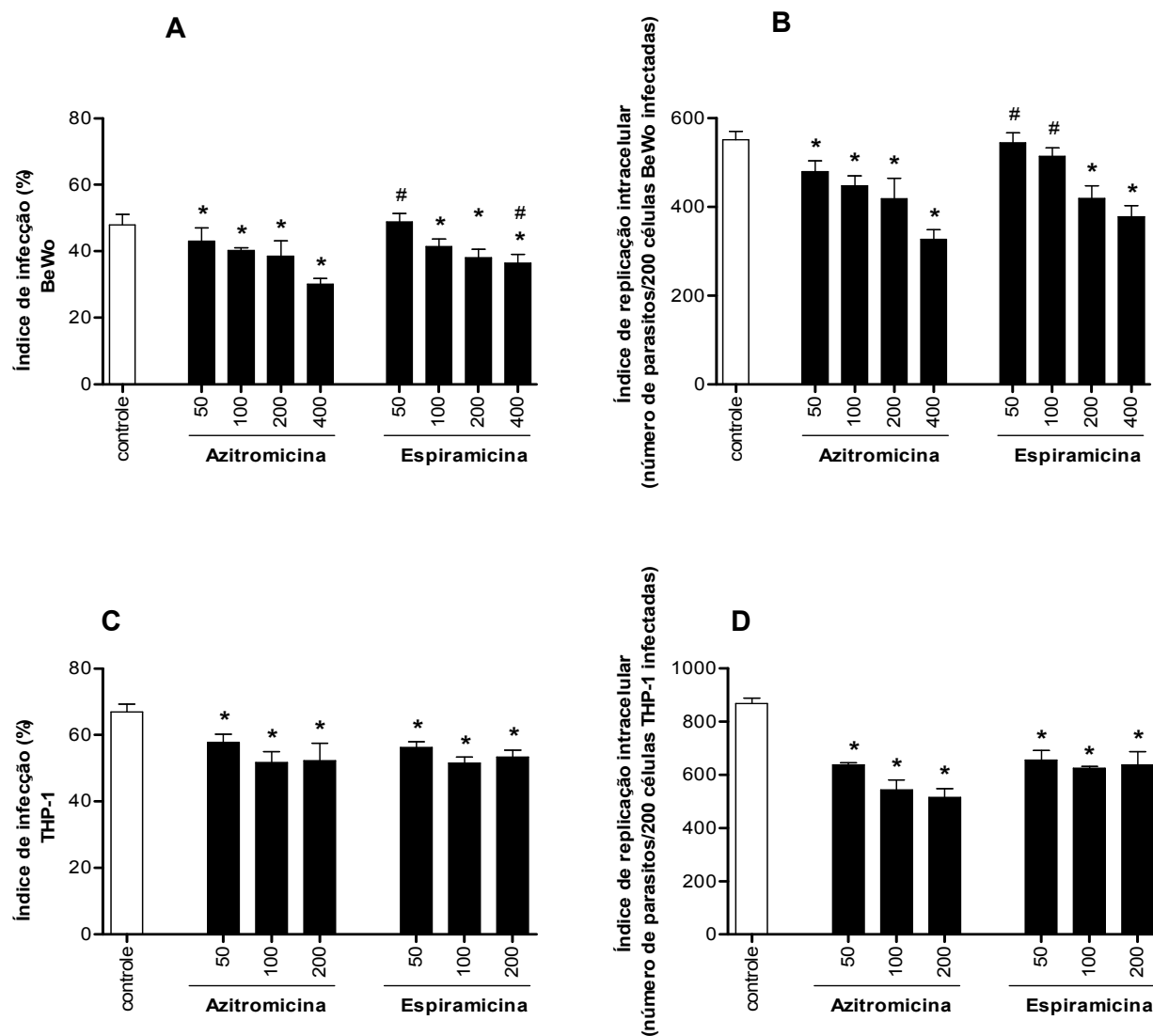


Figura. 2. Infecção por *T. gondii* e replicação intracelular em células BeWo e THP-1. Células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas redondas (13-mm) inseridas em placa de 24 poços e células THP-1 em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Em seguida, as células foram lavadas, fixadas, coradas com azul de toluidina e analisadas em relação ao índice de infecção (porcentagem de células infectadas em 200 células BeWo (A) e THP-1(C) examinadas) e à replicação intracelular do parasito (número de parasitos em 200 células BeWo (B) e THP-1 (D) infectadas). Os dados estão expressos em média $\pm$ DP e são representativos de três experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre células controle e infectadas/tratadas em cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina em cada concentração (teste t de Student, $p < 0,05$).

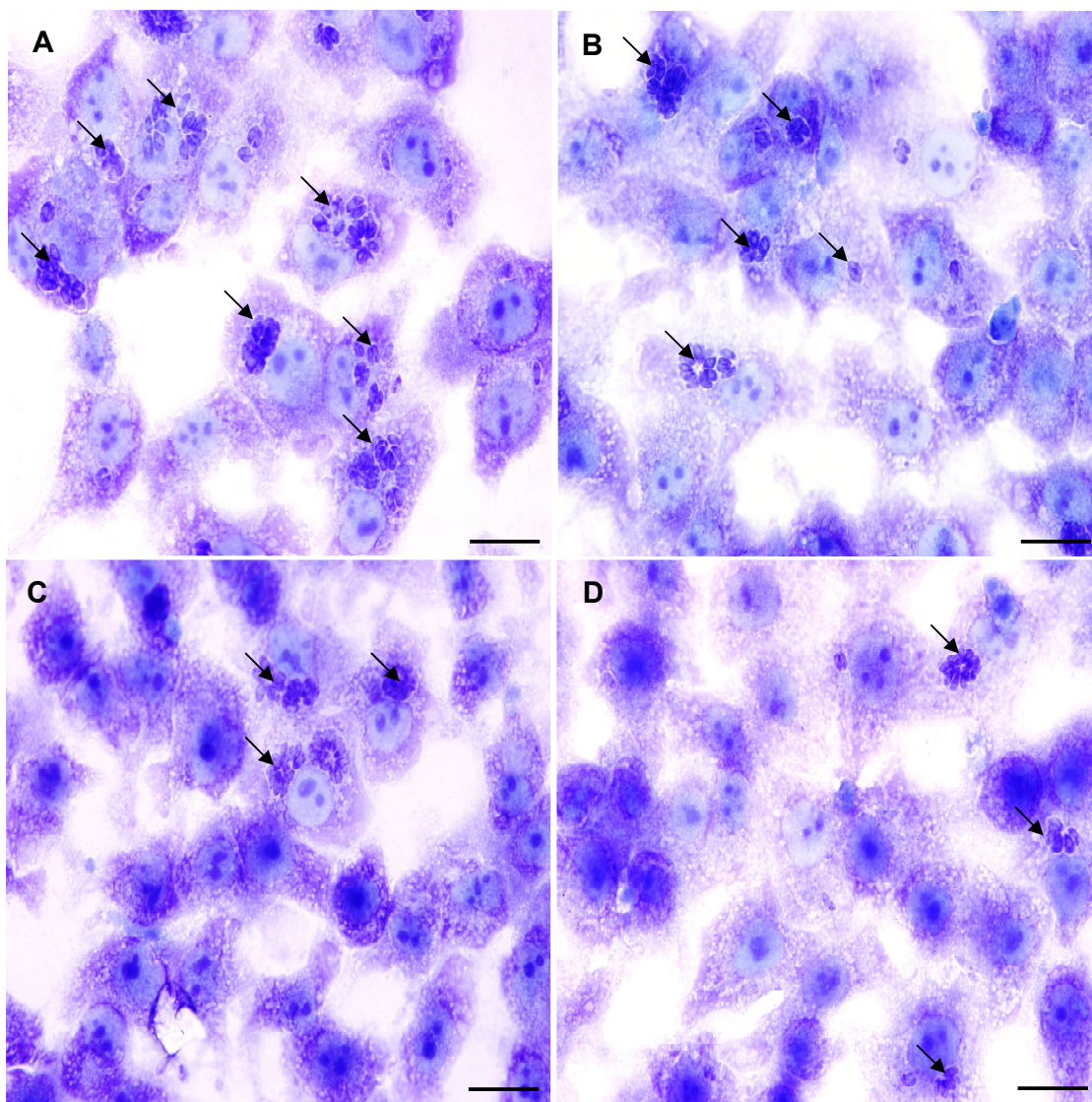
Figura 3

Figura 3. Fotomicrografia de células BeWo infectadas com *T. gondii* e tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina. Setas indicam parasitos no interior de vacúolos parasitóforos. Aumento de células infectadas e parasitos intracelulares em células não tratadas (A) e diminuição após tratamentos com 100 μg/mL e (B); 400 μg/mL (C) de azitromicina e 400 μg/mL (D) de espiramicina. Coloração com azul de toluidina. Escala da barra: 33 μm.

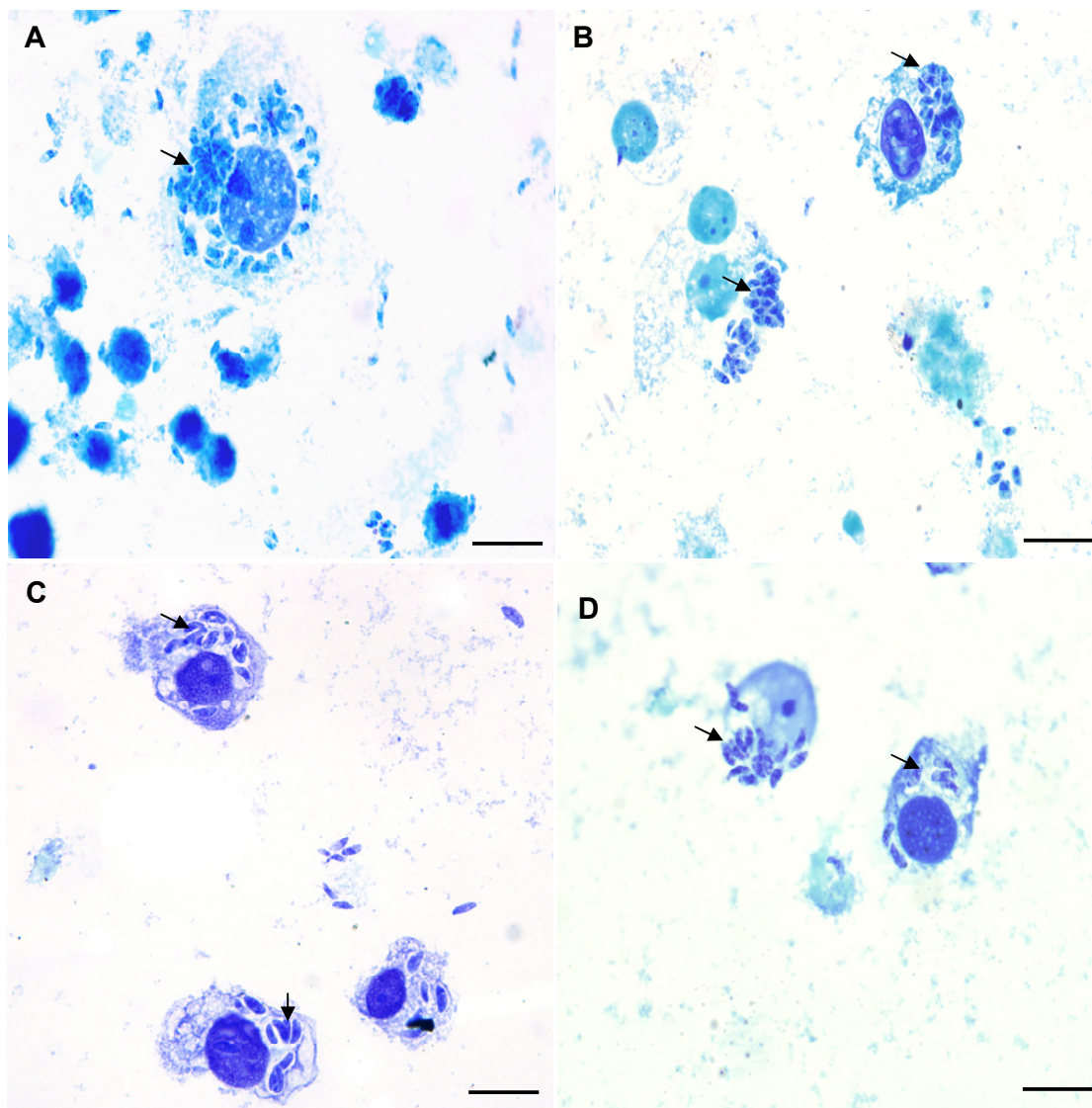
Figura 4

Figura 4. Fotomicrografia de células THP-1 infectadas com *T. gondii* e tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina. Setas indicam parasitos no interior de vacúolos parasitóforos. Aumento de parasitos intracelulares em células não tratadas (A) e diminuição após tratamentos com 100 µg/mL (B); e 200 µg/mL (C) de azitromicina e 100 µg/mL (D) de espiramicina. Coloração com azul de toluidina. Escala da barra: 33 µm.

Figura 5

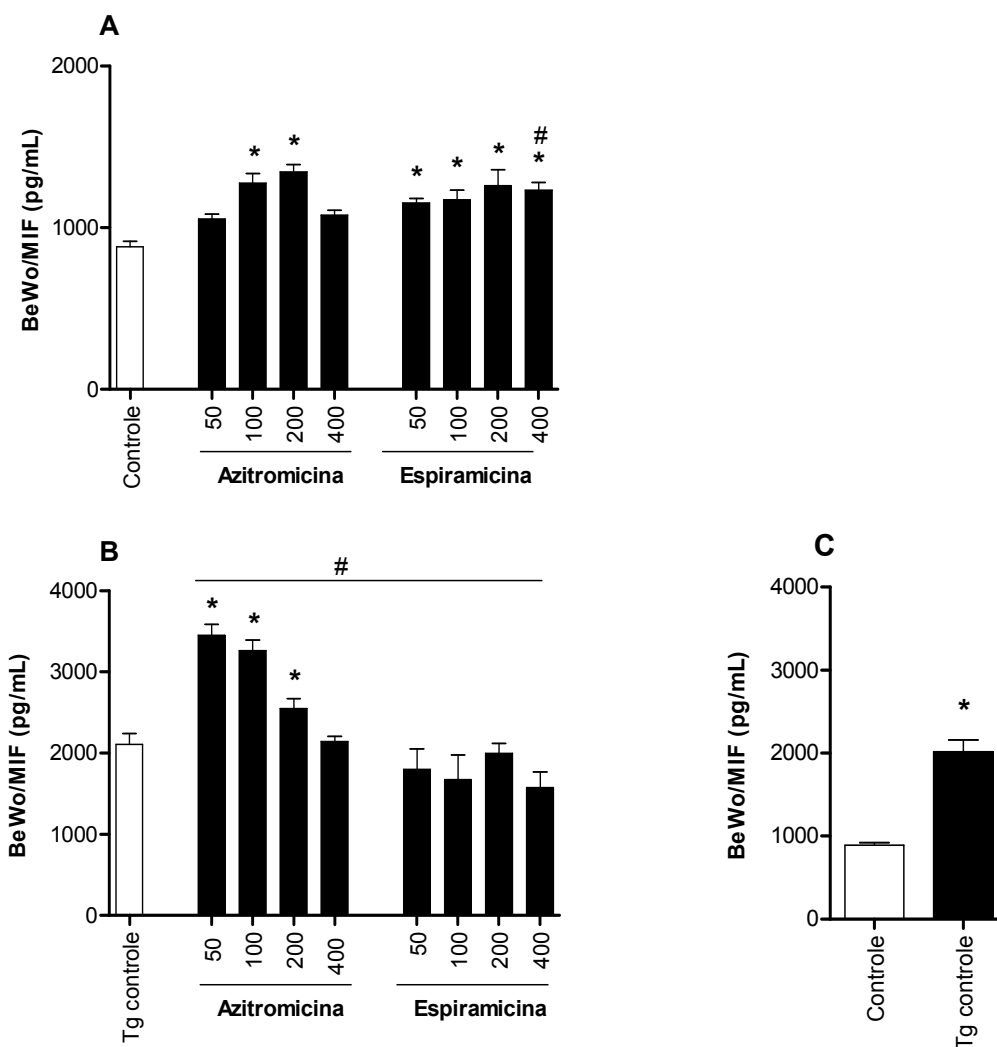


Figura 5. Produção de MIF por células BeWo após infecção por *T. gondii* e tratamento com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina. Células BeWo foram cultivadas sobre laminulas redondas (13-mm) inseridas em placa de 24 poços na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂ . Após 24 horas, ambas as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de MIF por ELISA. **(A)** células BeWo tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina; **(B)** células BeWo infectadas e tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina; **(C)** células BeWo não infectadas e não tratadas (controle) e células infectadas e não tratadas (Tg controle). Os dados estão expressos como média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre células controle e células tratadas ou células Tg controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste *t* de Student, $p < 0,05$). *Comparação entre controle e Tg controle (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 6

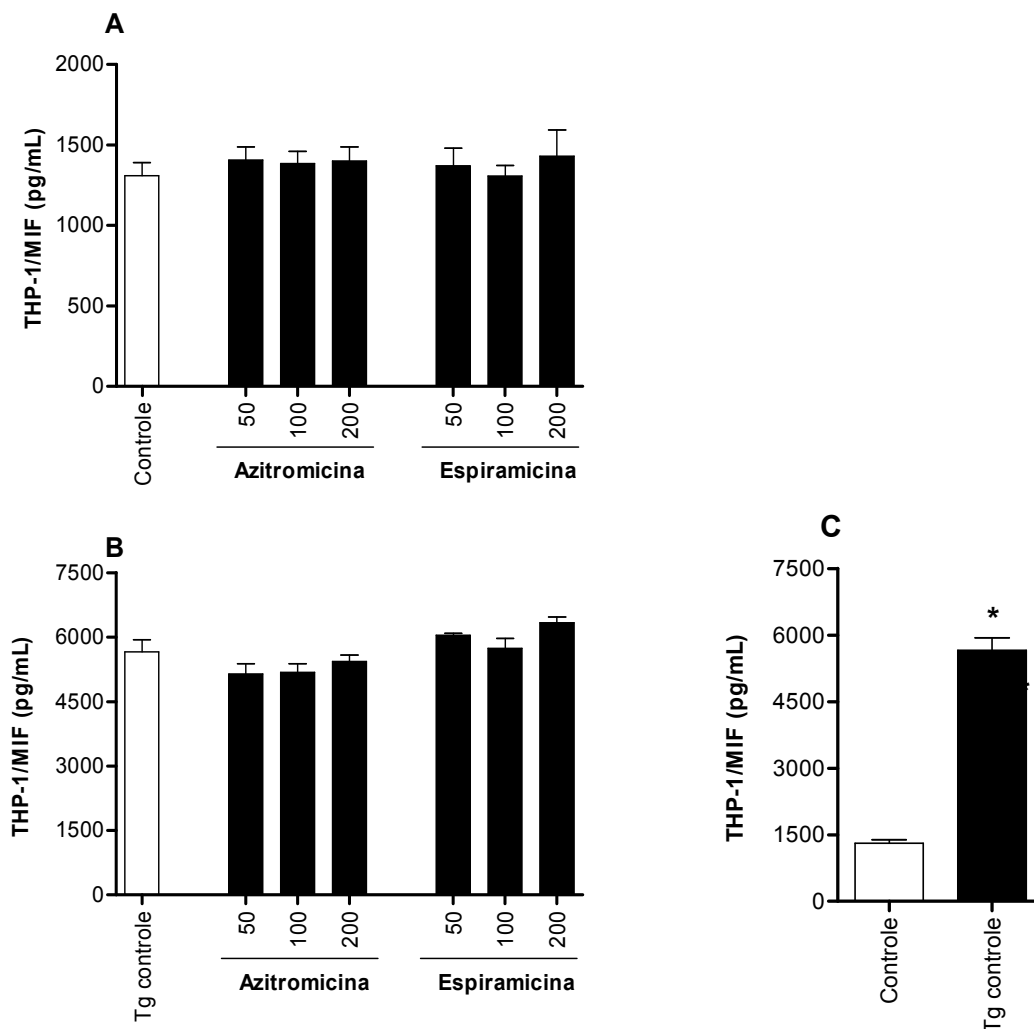


Figura 6. Produção de MIF por células THP-1 após infecção por *T. gondii* e tratamento com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina. Células THP-1 foram cultivadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células /200 µl/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, ambas as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de MIF por ELISA. **(A)** células THP-1 tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina; **(B)** células THP-1 infectadas e tratadas com concentrações crescentes de azitromicina ou espiramicina; **(C)** células THP-1 não infectadas e não tratadas (controle) e células infectadas e não tratadas (Tg controle). Os dados estão expressos como média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre células controle e células tratadas ou células Tg controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste *t* de Student, $p < 0,05$). *Comparação entre controle e Tg controle (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 7

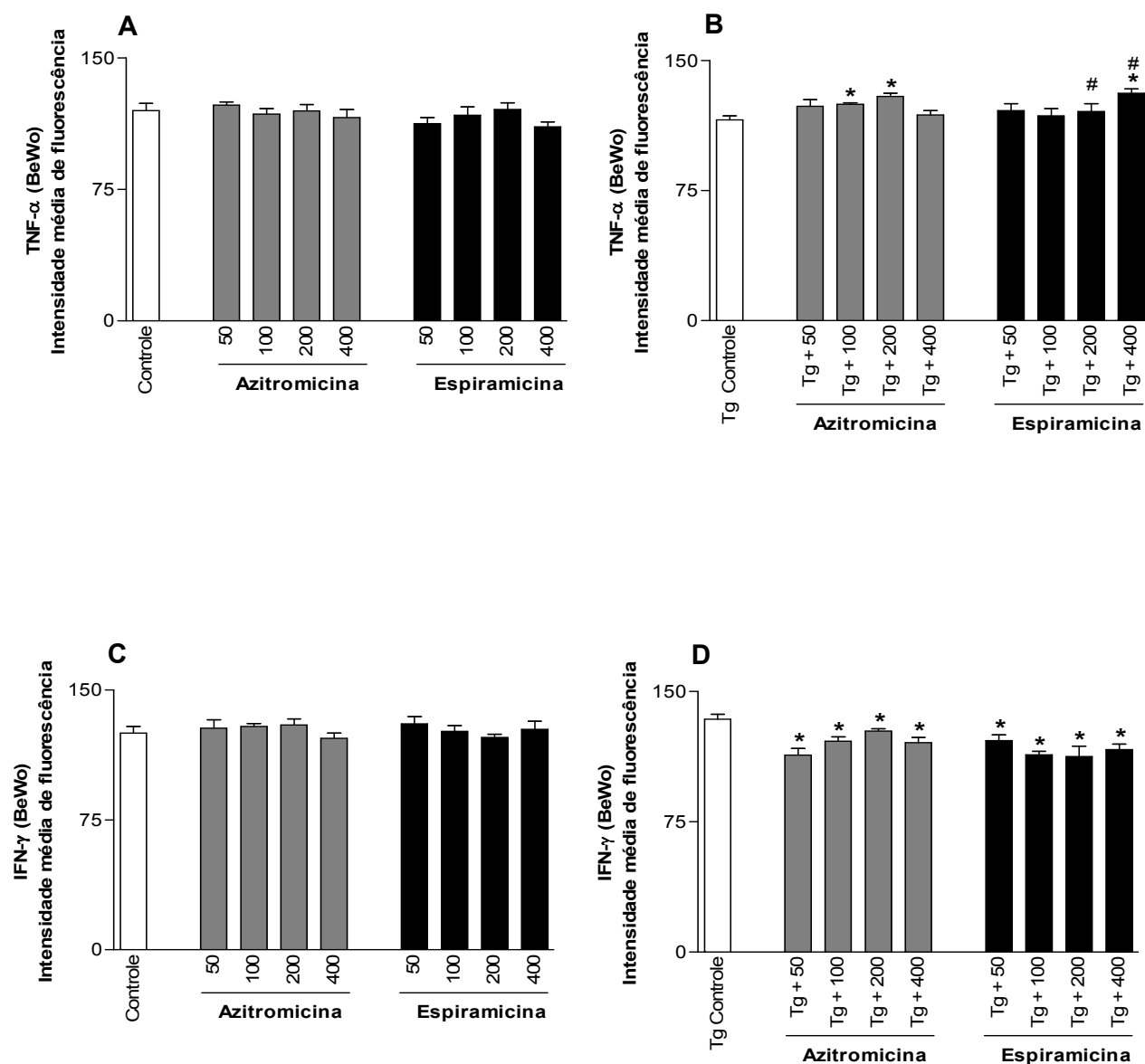


Figura 7. Produção de citocinas do perfil Th1e Th2 por células BeWo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina. Células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas redondas (13-mm) inseridas em placa de placa de 24 poços na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas foi mensurado por Cytometric Bead Array (CBA). Produção de TNF-α (A); IFN-γ (C); IL-10 (E); IL-4 (G) por células BeWo não infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Produção de TNF-α (B); IFN-γ (D); IL-10 (F); IL-4 (H) por células BeWo infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos em triplicata. *Comparação entre células controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 7

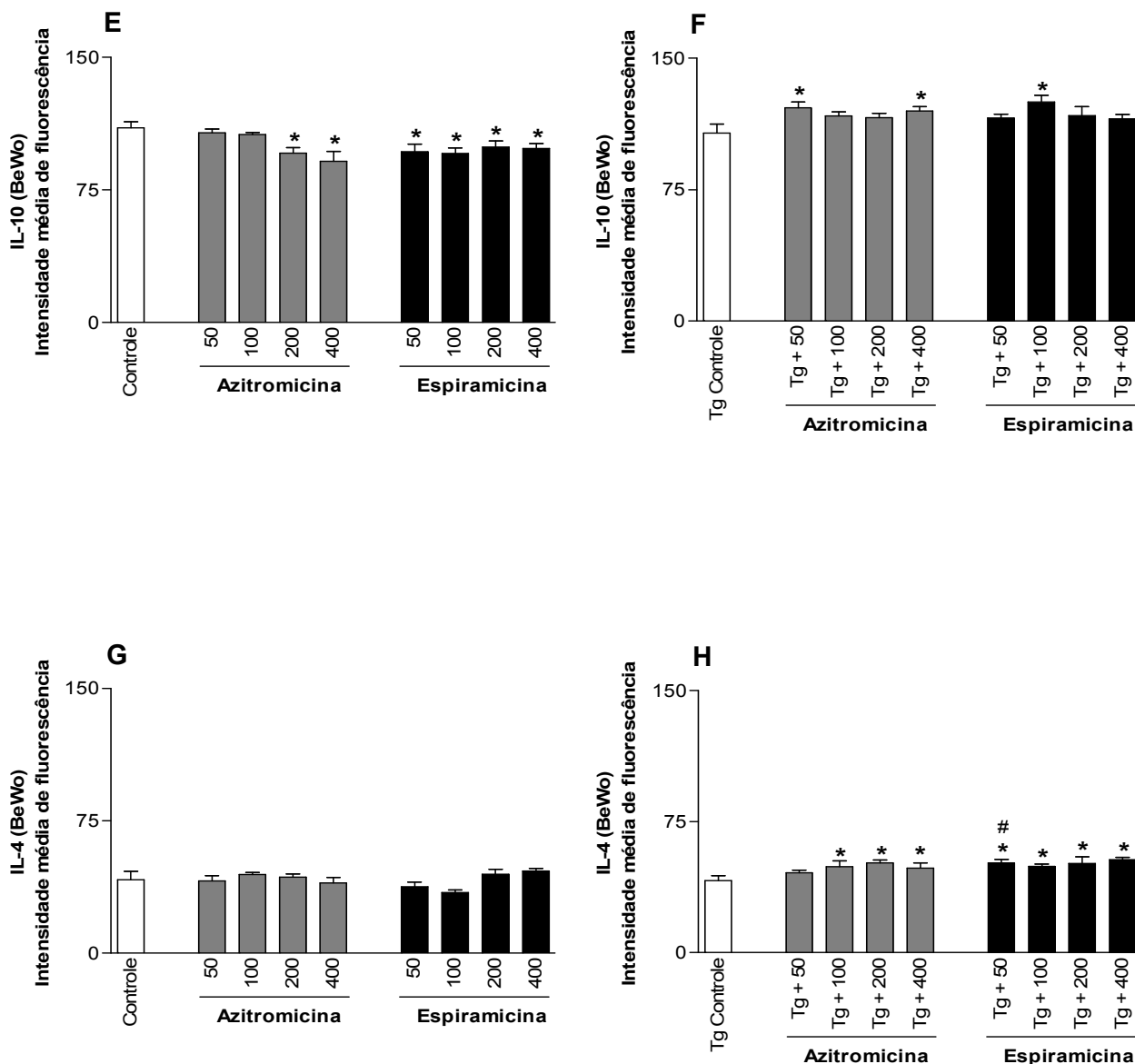


Figura 7. Produção de citocinas do perfil Th1e Th2 por células BeWo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina. Células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas redondas (13-mm) inseridas em placa de placa de 24 poços na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas foi mensurado por Cytometric Bead Array (CBA). Produção de TNF- α (A); IFN- γ (C); IL-10 (E); IL-4 (G) por células BeWo não infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Produção de TNF- α (B); IFN- γ (D); IL-10 (F); IL-4 (H) por células BeWo infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos em triplicata. *Comparação entre células controle e células tratadas ou células Tg controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste t de Student, $p < 0,05$).

Figura 8

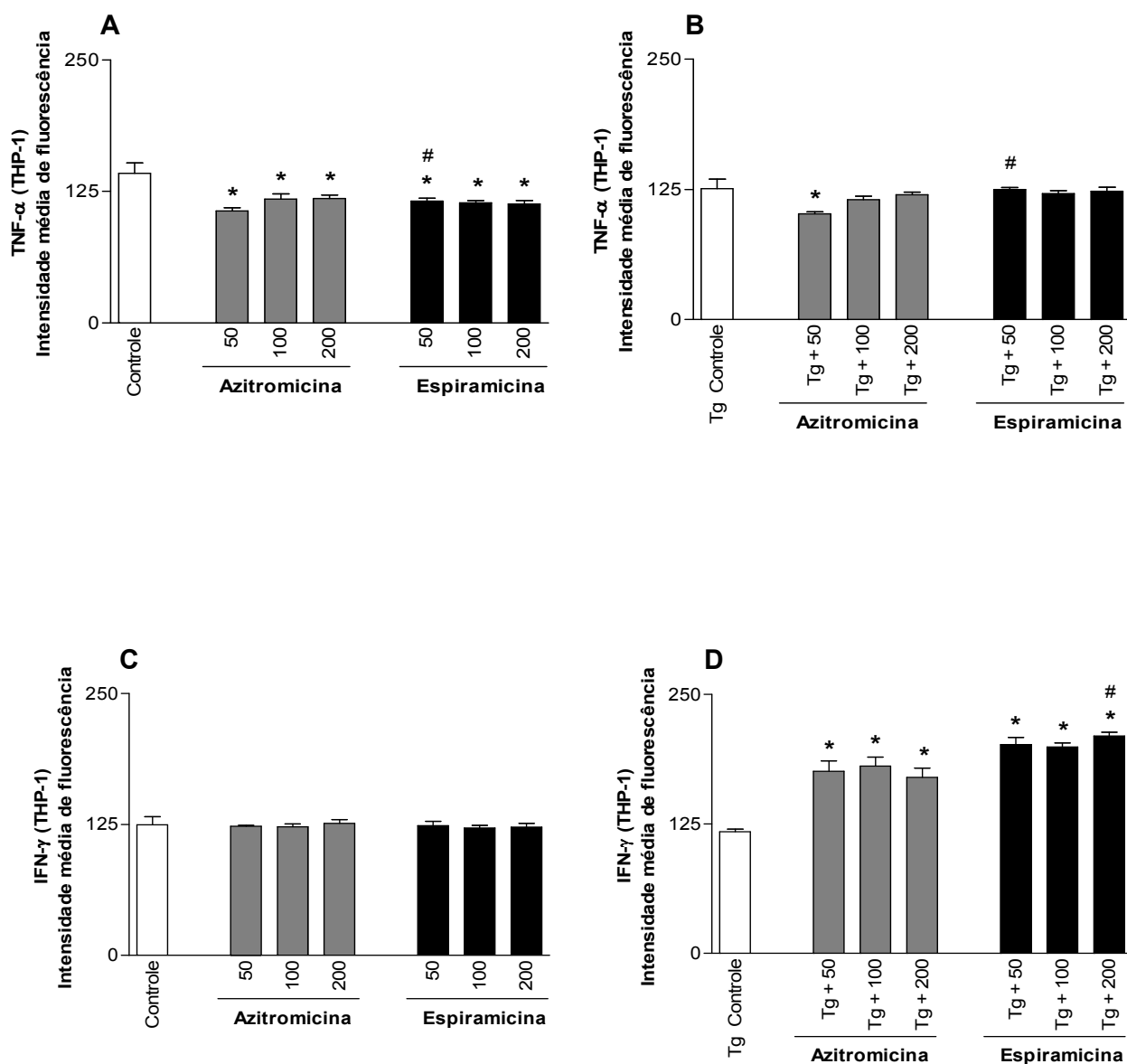


Figura 8. Produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 por células THP-1 infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina. Células THP-1 foram cultivadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas foi mensurada por Cytometric Bead Array (CBA). Produção de TNF- α (A); IFN- γ (C); IL-2 (E); IL-10 (G); IL-4 (I) e IL-5 (L) por células THP-1 não infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Produção de TNF- α (B); IFN- γ (D); IL-2 (F); IL-10 (H); IL-4 (J) e IL-5 (M) por células THP-1 infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos em triplicata. *Comparação entre células controle e células tratadas ou células Tg controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste t de Student, $p < 0,05$).

Figura 8

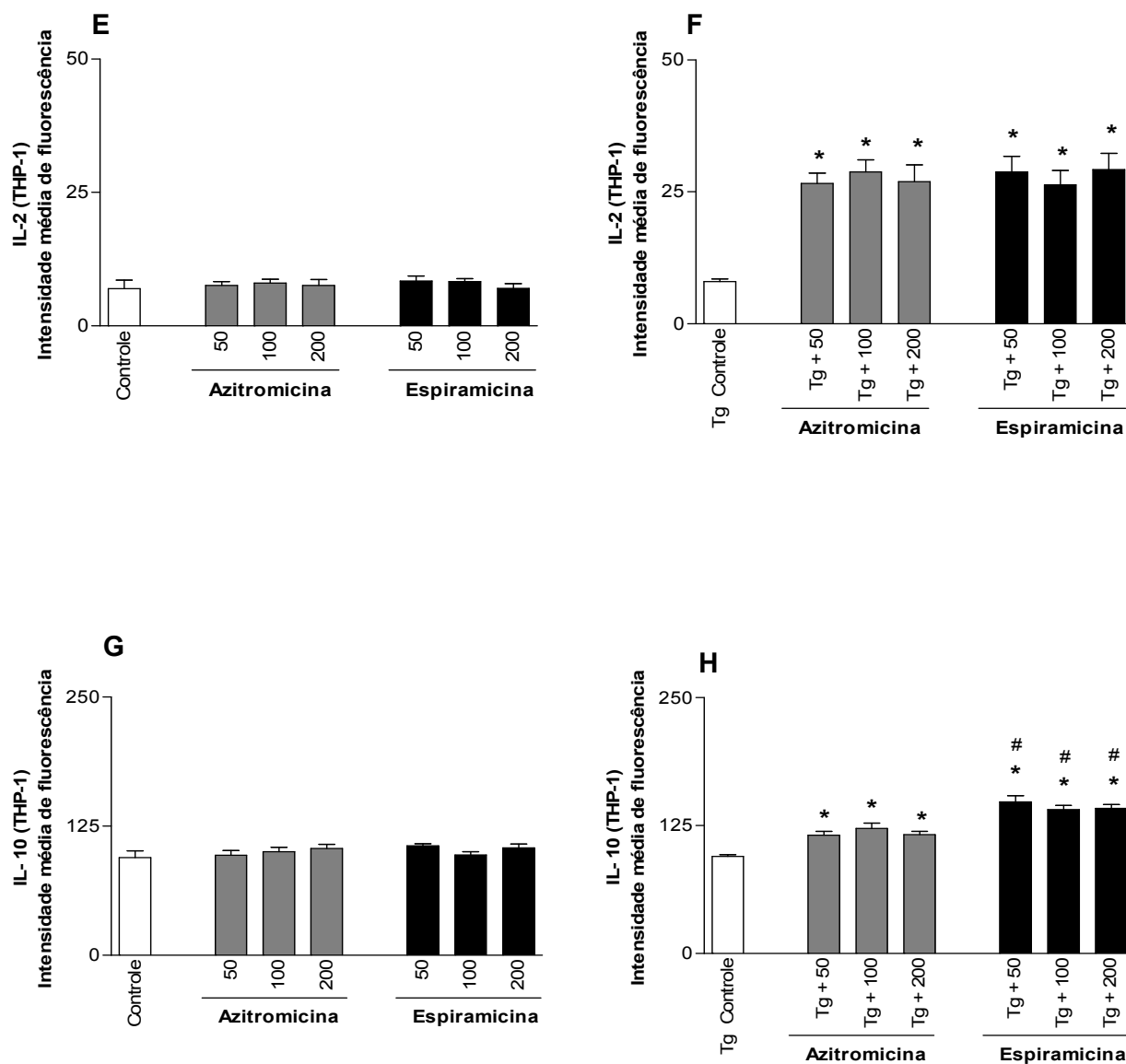


Figura 8. Produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 por células THP-1 infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina. Células THP-1 foram cultivadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas foi mensurada por Cytometric Bead Array (CBA). Produção de TNF- α (A); IFN- γ (C); IL-2 (E); IL-10 (G); IL-4 (I) e IL-5 (L) por células THP-1 não infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Produção de TNF- α (B); IFN- γ (D); IL-2 (F); IL-10 (H); IL-4 (J) e IL-5 (M) por células THP-1 infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos em triplicata. *Comparação entre células controle e células tratadas ou células Tg controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste t de Student, $p < 0,05$).

Figura 8

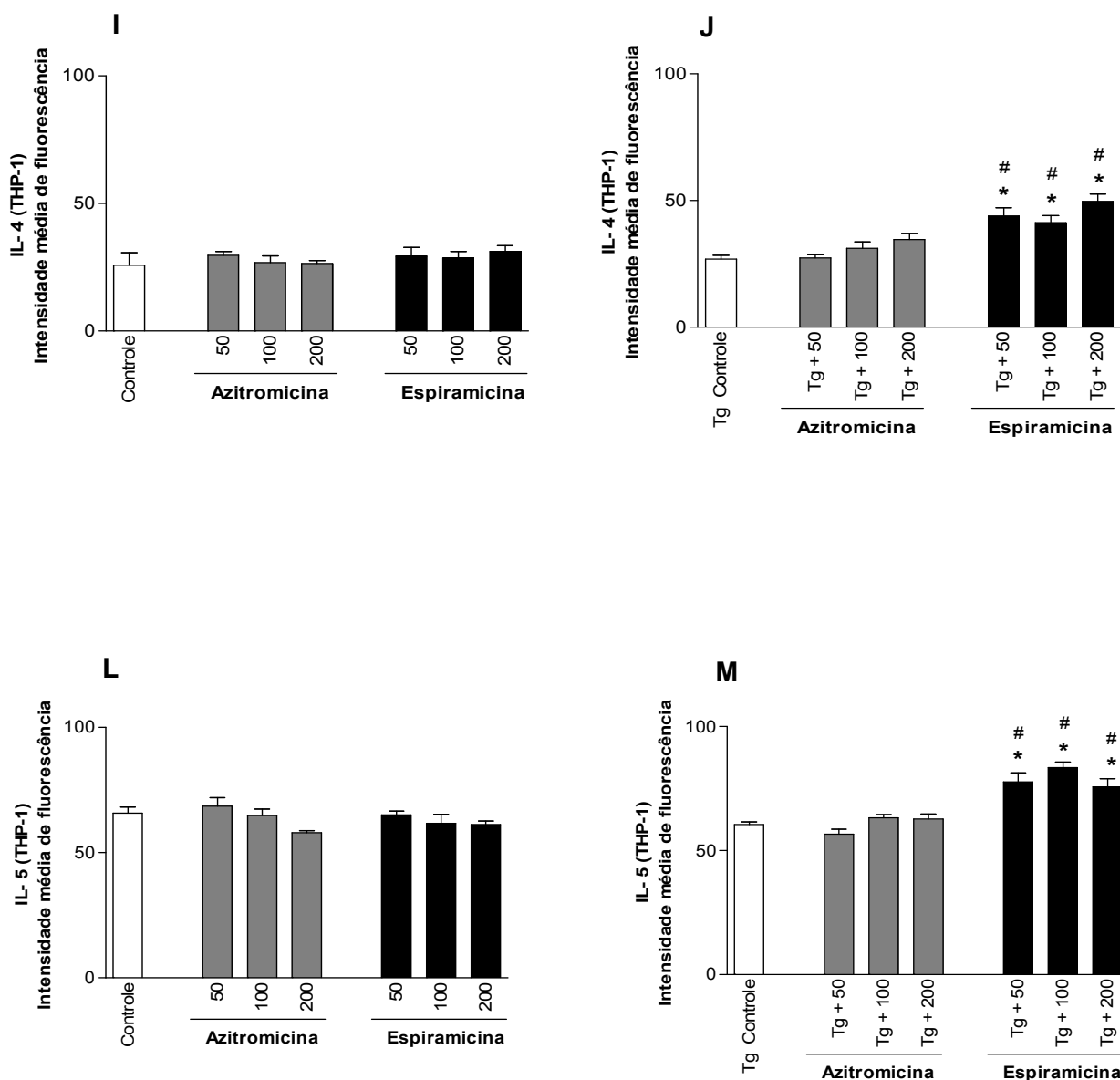


Figura 8. Produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 por células THP-1 infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com diferentes concentrações de azitromicina ou espiramicina. Células THP-1 foram cultivadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células /200 μ l/poço a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção 3:1(parasito:célula). Depois, foram tratadas com as azitromicina ou espiramicina e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas foi mensurada por Cytometric Bead Array (CBA). Produção de TNF- α (A); IFN- γ (C); IL-2 (E); IL-10 (G); IL-4 (I) e IL-5 (L) por células THP-1 não infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Produção de TNF- α (B); IFN- γ (D); IL-2 (F); IL-10 (H); IL-4 (J) e IL-5 (M) por células THP-1 infectadas e tratadas com azitromicina ou espiramicina. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP e são representativos de dois experimentos em triplicata. *Comparação entre células controle e células tratadas ou células Tg controle e células infectadas/tratadas para cada condição de tratamento (Testes ANOVA e Dunnett $p < 0,05$). #Comparação entre células tratadas com azitromicina ou espiramicina (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Tabela 1. Replicação *T. gondii* em células BeWo infectadas e tratadas com concentrações crescentes (50-400 µg/mL) de azitromicina ou espiamicina.

Drogas	Inibição da replicação de <i>T. gondii</i> em células BeWo ^a	
	Índice de replicação intracelular	Inibição da replicação (%)
Tg controle	551,2± 19,71	-
50 AZ	479,4 ± 24,41 *	13,02
100 AZ	447,6 ± 22,91 *	18,90
200 AZ	418,8 ± 46,12 *	24,02
400 AZ	326,5 ± 22,11 *	40,76
50 SP	544,8 ± 22,34	1,16 [#]
100 SP	514,2± 19,16	6,71 [#]
200 SP	419,3 ± 28,50 *	23,92
400 SP	378,0 ± 25,00 *	31,42

* Resultados indicam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata. Resultados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparado células infectadas e tratadas com células infectadas e não tratadas.

[#]A diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado resultados entre células BeWo tratadas com azitromicina ou espiamicina.

Tabela 2. Replicação *T. gondii* em células THP-1 infectadas e tratadas com concentrações crescentes (50-400 µg/mL) de azitromicina ou espiramicina.

Drogas	Inibição da replicação de <i>T. gondii</i> em células THP-1	
	Índice de replicação intracelular	Inibição da Replicação (%)
Tg controle	867,7± 21,27	-
50 AZ	663± 9,152*	23,59
100 AZ	543,5± 36,53*	37,36
200 AZ	515,2± 33,39*	40,62
50 ESP	614,2± 46,63*	29,21
100 ESP	625,0 ± 7,47*	27,97
200 ESP	655,5 ± 35,72*	24,45

* Resultados indicam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata. Resultados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparado células infectadas e tratadas com células infectadas e não tratadas.

REFERÊNCIAS

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.72, n. 3, p. 1397-1401, Mar., 2004.

AJZENBERG, D.; YERA, H.; MARTY, P.; PARIS, L.; DALLE, F.; MENOTTI, J.; AUBERT, D.; FRANCK, J.; BESSIERES, M.; QUINIO, D.; PELLOUX, H.; DELHAES, L.; DESBOIS, N.; THULLIEZ, P.; ROBERT-GANGNEUX, F.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; PUJOL, S.; RABODONIRINA, M.; BOUGNOUX, M.; CUISENIER, B.; DUHAMEL, C.; DUONG, T.H.; FILISETTI, D.; FLORI, P.; GAY-ANDRIEU, F.; PRATLONG, F.; NEVEZ, G.; TOTET, A.; CARME, B.; BONNABAU, H.; DARDÉ, M.; VILLENA, I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 199, n. 8, p. 1155-1167, Apr., 2009.

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 5, n. 2, p.162-170, Feb., 2005.

AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais Academia Nacional Medicina**, Brasil, v. 155, n. 4, p. 224-225, 1995.

ANDRADE, G. M. Q.; CARVALHO, A. L.; CARVALHO, I.R.; MELLO, B. F.; TIBÚRCIO, F. R.; CASTRO, F. C. Toxoplasmose na gestante e no recém nascido-Estudo de 86 pares de mãe-filho atendidos no período de 1996-99 no ambulatório de infectologia pediátrica do HC-UFG. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 11, n. 4, p. 202-207, 2001.

ARAÚJO, F. G.; SHEPARD, R. M.; REMINGTON, J. S. *In vivo* activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, Wiesbaden, v. 10, n. 6, p. 519-524, Jun., 1991.

ASHBURN, D.; JOSS, A. W.; PENNINGTON, T. H.; HO-YEN, D. O. Do IgA, IgE and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasmose infection in pregnancy? **Journal Clinical Patology**, London, v. 51, n. 4, p. 312-315, Apr., 1998.

BAATZ, H.; MIRSHAHI, A.; PUCHTA, J.; GUMBEL, H.; HATTENBACH, L.O. Reactivation of toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. **Ocular immunology and inflammation**, Buren, v. 14, n. 3, p. 185-187, Jun., 2006.

BAHN, R. S.; WORSHAM, A.; SPEEG, K. V. JR; ASCOLI, M.; RABIN, D. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 52, n. 3, p. 447-450, Mar., 1981.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, England, v. 392, n. 6673, p. 245-252, Mar., 1998.

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

BARRAGAN, A; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. **Sub-cellular Biochemistry**, London, v. 47, p.198-207, 2008.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, n. 12, p.1625-1633, Jun., 2002.

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

BENNETT, W. A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; WHITWORTH, N. S.; BRACKIN, M. N.; HALE, E.; COWAN, B. D. Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. **Early pregnancy: biology and medicine**, Cherry Hill, v. 3, n. 3, p. 190-198, Sep., 1997.

BERKMAN, N.; JOHN, M.; ROESEMS, G.; JOSE, P. J.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1-a expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.155, n. 9, p. 4412–4418, Nov., 1995.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. **Journal Molecular Medicine**, Germany, v. 76, n. 3-4, p.151-161, Mar, 1998.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; MITCHELL, R. A.; MARTIN, S. B.; TRACEY, K. J.; VOELTER, W.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, United States, v. 365, n. 6448, p. 756-9, Oct, 1993.

BLANCO-LAGO, R.; GARCÍA-PEÑAS, J. J.; CONEJO - MORENO, D.; CANTARÍN-EXTREMA, V.; LEÓN, M.; DUAT-RODRIGUEZ, A. Congenital toxoplasmosis and cortical development malformation: na infrequent association. **Revista de Neurología**, Spain, v. 50, n. 4, p. 16-28, Feb., 2010.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **Journal Experimental Medicine**, Germany, v. 174, n. 6, p. 1549–1555, Dec., 1991.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 4, p. 438-442, Aug., 2002.

BOSNAR, M.; KELNERIC', Z.; MUNIC', V.; ERAKOVIC', V.; PARNHAM, M. J. Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2372–2377, Jun., 2005.

BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISGER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; McLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 192, n.2, p. 564-571, Fev., 2005.

BRAZ, L. M. A.; DI PIETRO, A. O.; AMATO NETO, V.; FRANÇA, F. O. S. Avaliação da eficácia da azitromicina e da pirimetamina, usadas isolada ou associadamente, no tratamento de infecção experimental de camundongos pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Brasil, v. 32, n. 4, p. 401-403, 1999.

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

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; SPIEGEL, L. A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as glucocorticoid-induced counter-regulator of cytokine production. **Nature**, United States, v. 377, nº 6544, p. 68-71, Set, 1995.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 213-218, Maio-Jun., 1991.

CARRUTHERS, V. B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 1-10, Mar., 1999.

CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 10, n. 1, p. 83-89, Feb., 2007.

CARVALHO-PINTO, C. E.; GARCÍA, M. I.; MELLADO, M.; RODRÍGUEZ-FRADE, J. M.; MARTÍN-CABALLERO, J.; FLORES, J.; MARTÍNEZ-A, C.; BALOMENOS, D. Autocrine production of IFN-gamma by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 2, p. 1058-1067, Jul., 2002.

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. **Journal of Infectious Diseases**, New York, v. 186, n. 9, p. 1371-1375, Nov., 2002.

CHAMBERLAND, S.; KIRST, H. A.; CURRENT, W. L. Comparative activity of macrolides against *Toxoplasma gondii* demonstrating utility of an *in vitro* microassay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 35, n. 5, p. 903-909, May, 1991.

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

CHAVES, A. C.; CERÁVOLO, I. P.; GOMES, J. A.; ZANI, C. L.; ROMANHA, A. J.; GAZZINELLI, R. T. IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN- γ . **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 31, n.2, p. 333–344, Feb., 2001.

CHERNOFF, A. E.; GRANOWITZ, E. V.; SHAPIRO, L.; VANNIER, E.; LONNEMANN, G.; ANGEL, J. B.; KENNEDY, J. S.; RABSON, A. R.; WOLFF, S. M.; DINARELLO, C. A. A randomized controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 154, n. 10, p. 5492–5499, May, 1995.

COSTA, I. N.; ANGELONI, M. B.; SANTANA, L. A.; BARBOSA, B. F.; SILVA, M. C. P.; RODRIGUES, A. A.; ROSTKOWSA, C.; MAGALHÃES, P. M.; PENA, J. D.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, London, v. 30, n. 10, p. 884–890, Oct.; 2009.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, May, 2008.

COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GÂTEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, United States, v. 107, n.1, p. 309–16, jan., 2006.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 178, n. 3, p. 1041–1048, Sep., 1993.

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

DE WAAL MALEFYT, R.; FIDGOR, C. G.; HUIJBENS, R.; MOHAN-PETERSON, S.; BENNETT, B.; CULPEPPER, J.; DANG, W.; ZURAWSKI, G.; DE VRIES, J. E. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 151, n. 11, p. 6370–6381, Dec., 1993.

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 4, p. 569-588, Oct., 1998.

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

DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C. H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, London, v. 134, Pt 11, p. 1559–1565, Oct., 2007.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, Sep., 2008.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 2, p. 267-299, Apr., 1998.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, n. 2, p. 270 - 273, Feb., 1993.

DUMÈTRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 3-4, p. 209-213, May, 2008.

DUNAY, I. R. ; HEIMESAAT, M. M. ; BUSHRAB, F. N. ; MULLER, R. H. ; STOCKER, H. ; ARASTEH, K. ; KUROWSKI, M. ; FITZNER, R. ; BORNER, K. ; LIESENFELD, O. Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4848–4854, Dec., 2004.

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, Oxford, v. 122, n. 4, p. 335-353, Apr., 2008.

FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R.; OLIVEIRA, J. G.; FERRO, E. A.; SOUZA, M. A.; SANTOS, A. A. *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions *in vivo* and *in vitro*: experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Microbes and infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 6, n. 2, p. 172-181, Feb., 2004.

FERRO, E. A.; MINEO, J. R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D. A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L. R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.172, n.1, p. 50-58, Jan., 2008.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 40, n. 1, p. 71–80, 2004.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E. P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A. A.; SHENOY, A. S.; TERRAZAS, L. I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 22, n. 10, p. 3661–3671, Oct., 2008.

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

FRUCHT, D. M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J. J.; KOYASU, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 556–560, Oct., 2001.

GAGNE, S. S. Toxoplasmosis. **Primary Care Update for Obstetricians and Gynecologists**, United States, v. 8, p. 122–126, May, 2001.

GARIN, J. P. ; EYLES, E. E. Le traitement de la toxoplasmose experimentale de la souris par la spiramycine. **La Presse Médicale**, Paris, v. 66, p. 957–958, 1958.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 153, n. 6, p. 2533–2543, Sep., 1994.

GILMAN, A. O. As bases farmacológicas da terapêutica .8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GOMES, A. O. **Papel de MIF (Fator de Inibição de Migração de Macrófagos) na proteção de células trofoblásticas (BeWo) e explantes placentários de terceiro trimestre contra infecção por *Toxoplasma gondii***. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2008.

GORDAN, E.; BLUMER, J. Rationale for single and high dose treatment regimens with azithromycin. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore v. 23, n. 2, p. S102–107, Feb., 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Review Immunology**, London, v. 3, n. 1, p. 23–35, Jan., 2003.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Annali Dell Istituto Superiore di Sanità**, Roma v. 40, n. 1, p. 67–70, 2004.

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

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, Verlag, v. 3, n. 2, p. 84-105, Jun. 2003.

HONORÉ, S.; COUVELARD, A. GARIN, Y.J.; BEDEL, C.; HÉNIN, D.; DARDÉ, M. L.; DEROUIN, F. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strain from immunocompromised patients. **Pathologie-Biologie**, Paris, v.48, n. 6, p. 541-547, Jul., 2000.

HOWE, D. R.; HONORE, S.; DEMOUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, Jun.; 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlations of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infection Disease**, Oxford, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, Aug., 1995.

IETTA, F.; WU, Y.; ROMAGNOLI, R.; SOLEYMANLOU, N.; ORSINI, B.; ZAMUDIO, S.; PAULESU, L.; CANIGGIA, I. Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. 272-280, Jan., 2007.

JEFFREY, D.; KRAVETZ, M. D.; DANIEL, G.; FEDERMAN, M. D. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

JEFFRIES, A. C.; JOHNSON, A. M. The growing importance of the plastid like DNAs of the apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 11, p. 1139-1150, Nov., 1996.

JOINER, K. A.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 61, n. 4, p. 1169-1172, Apr., 1993.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American Family Physician**, United States, v. 67, n.10, p. 2131-2138, May, 2003.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetric Gynecology Survival**, Colorado, v. 56, n. 5, p. 296-305, May, 2001.

JU, C. H.; CHOCKALINGAM, A.; LEIFER, C. A. Early response of mucosal epithelial cells during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, Balimore, v. 183, n. 11, p. 7420-7, Dec., 2009.

JUTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; RÖLLINGHOFF, M.; BUCALA. R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. **Journal of Immunology**, Balimore, v. 16, n. 5, p. 2383-2390, Sep., 1998.

KARABULUT, A. K.; UYSAL, I. I.; ACAR, H.; FAZLIOGULLARI, Z. Investigation of developmental toxicity and teratogenicity of macrolide antibiotics in cultured rat embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 369-375, Oct., 2008.

KATZUNG, B. C. **Farmacologia Básica & Clínica**, 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 546 – 554, 2006.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000, cap. 18, p. 147-156.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Ed.: Atheneu. 11ª ed. São Paulo, p. 147-156, 2005.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 423-432, Mar., 2004.

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

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

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, New York, v.118, n. 3, p. 212-216, Mar., 2005.

LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.8, n. 19, p. 1611-1623, Oct., 2006.

LAVINE, M. D.; ARRIZABALAGA, G. Invasion and egress by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*: potential targets for the development of new antiparasitic drugs. **Current Pharmaceutical Desingn**, Schiphol, v. 13, n.6, p. 641-651, 2007.

LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Association of CD+ T cell-dependent, interferon-gama-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii* . **The Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 184, n. 2, p. 597-607, Aug., 1996.

LILES, W. C.; VAN VOORHIS, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, n. 6, p. 1573–1580, Dec., 1995.

LOPES, C. D.; SILVA, N. M.; FERRO, E. A.; SOUSA, R. A.; FIRMINO, M. L.; BERNARDES, E.S.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; PENA, J. D. Azithromycin reduces ocular infection during congenital transmission of toxoplasmosis in the *Calomys Callosus* model. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, n. 4, p. 1–9 Aug., 2009.

LOPES, F. M. R.; GONÇALVES, D. D.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 5, p. 496-506, Oct., 2007.

LUE, H.; KLEEMANN, R.; CALANDRA, T.; ROGER, T.; BERNHAGEN, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 4, n. 4, p. 449-460, Apr., 2002.

LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 198–201, May, 2002.

MANKIN, A. S. Macrolide myths. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n. 5, p. 414-421, Oct., 2008.

MCDEVITT, M. A.; XIE, J.; SHANMUGASUNDARAM, G.; GRIFFITH, J.; LIU, A.; MCDONALD, C.; THUMA, P.; GORDEUK, V. R.; METZ, C. N.; MITCHELL, R.; KEEFER, J.; DAVID, J.; LENG, L.; BUCALA, R. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 203, n. 5, p. 1185–1196, May, 2006.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, England, v. 39, n. 1, p. 23-39, Jan., 2009.

MILLROSE, M.; KRUSE, M.; FLICK, B.; STAHLMANN, R. Effects of macrolides on proinflammatory epitops on endothelial cells in vitro. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 83, n. 5, p. 469-476, May, 2008

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

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.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, London, v.363, n. 9425, p. 1965-1976, Jun., 2004.

MOORE, K. W.; DE WAAL, MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 19, p. 683–765, Apr., 2001.

MORRISSETTE, N.S.; SIBLEY, L.S. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 21–38, Mar., 2002.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potencial model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, n.6, p. 862-864, Sep., 2009.

NICOLLE, C.; MANCEUX, L. Sur une infection à corps de *Leishman* (ou organismes voisins) du *gondi*. **Compte Rend Academy Science**, Paris, v. 147, p. 763-766, Oct., 1908.

NISHIKAWA, Y.; ZHANG, H.; IBRAHIM, H. M.; UI, F.; OGISO, A.; XUAN, X. Construction of *Toxoplasma gondii* bradyzoite expressing the green fluorescent protein. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 219-222, Jun., 2008.

NOROSE, K.; AOSAI, F.; MIZOTA, A.; YAMAMOTO, S.; MUN, H. S.; YANO, A. Deterioration of visual function as examined by electroretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected IFN- γ knockout mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 46, n.1, p. 317–321, Jan., 2005.

O’GARRA, A.; VEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 7, n. 6, p. 425–428, Jun., 2007.

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

ONODERA, S.; SUZUKI, K.; MATSUNO, T.; KANEDA, K.; TAKAGI, M.; NISHIHARA, J. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. **Immunology**, England, v. 92, n. 1, p. 131-137, Sep., 1997.

OTUN, H. A.; LASH, G. E.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; NARUSE, K.; HANNON, T.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C. Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon-gamma on first trimester extravillous trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 88, n.1, p. 1–11, Jan., 2011.

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

PERITI, P.; MAZZEI, T.; MINI, E.; NOVELLI, A. Advers effects of macrolide antibacterials. **Drug Safety : an international journal of medical toxicology and drug experience**, New Zealand, v. 9, n. 5, p. 346–364, Nov., 1993.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 214-223, Feb., 2007.

PETROPOULOS, A. D.; KOUVELA, E. C.; STAROSTA, A. L.; WILSON, D. N.; DINOS, G. P.; KALPAXIS, D. L. Time-resolved binding of azithromycin to *Escherichia coli* ribosomes. **Journal Molecular Biology**, New York, v. 385, n. 4, p. 1179-1192, Jan., 2009.

PFAFF, A.W.; 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**, England, v. 83, n. 5, p. 483-489, Oct., 2005b.

PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; CANDOLFI, E. Different effect of *Toxoplasma gondii* infection on adhesion capacity of fibroblasts and monocytes. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 487–490, Sep., 2008.

PFAFF, A. W.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n.14, p. 1569-1576, Dec., 2005a.

PIAO, L. X.; AOSAI, F.; MUN, H. S.; YANO, A. Peroral infectivity of *Toxoplasma gondii* in bile and feces of IFN-gama knockout mice. **Microbiology and Immunology**, Australia, v. 49, n. 3, p. 239–243, 2005.

PINARD, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. **Journal of Midwifery & Women's Health**, New York, v. 48, n. 5, p. 308-316, 2003.

POZZI, L. A.; WEISER, W. Y. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill tumor cells. **Cellular Immunology**, New York, v. 145, n. 2, p. 372-379, Dec., 1992.

RADKE, J. R.; DONALD, R. G.; EIBS, A.; JEROME, M. E.; BEHNKE, M. S.; LIBERATOR, P.; White, M. W. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. e105, Oct., 2006.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, England, v. 13, n. 4, p. 219-227, Aug., 2001.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. In: **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, Toxoplasmosis**, 2001. Cap. 5, p. 205-345.

REY, L. *Toxoplasma gondii* e a toxoplasmose, In: REY, L. **Parasitologia**, 3.ed. Rio de Janeiro- RJ: Guanabara Koogan S. A., 2001, cap. 25, p. 321-334.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L. I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMEZ-GARCÍA, L.; SNIDER, H.; SATOSKAR, A. R.; RODRÍGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 74, n. 6, p.3170–3179, Jun., 2006.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 476-488, Jul., 2001.

ROBINSON, C. M.; O'DEE, D.; HAMILTON, T.; NAU, G. J. Cytokines involved in interferon-gamma production by human macrophages. **Journal of Innate Immunity**, Basel, v. 2, n. 1, p. 56–65, Dec., 2009.

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

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

RUBINSTEIN, E.; KELLER, N. Spiramycin renaissance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 42, n. 5, p. 572-576, Nov., 1998.

SATOSKAR, A. R.; BOZZA, M.; RODRIGUEZ SOSA, M.; LIN, G.; DAVID, J. R. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, n. 2, p. 906-11, Feb., 2001.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 75, n. 2, p. 163-89, Feb., 2004.

SERPIER, H.; GILLERY, P.; SALMON-EHR, V.; GARNOTEL, R.; GEORGES, N.; KALIS, B.; MAQUART, F. X. Antagonistic effects of IFN- γ and interleukin-4 on fibroblast cultures. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 109, n. 2, p. 158-162, Aug., 1997.

SHARMA, S. D. Immunology of toxoplasmosis, In: WYLER, D. J. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunology and Molecular Aspects**. New York: W. H. Freeman, 1990, p. 184-199.

SHIRAHATA, T.; MUROYA, N.; OHTA, C.; GOTO, H.; NAKABE, A. Correlation between increased susceptibility to primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy mice. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n. 1, p.81-91, 1992.

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

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

SONDA, S.; HEH, A. Lipid biology of Apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 41-47, Jan., 2006.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. In contratto nelle lesioni anatomiche d una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Revista Academia Ciência**, São Paulo, v.3, n. 109, p. 109-112, 1908.

SUZUKI, Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, Suppl. 1, p. 58-65, Feb., 2002.

SZARKA, A.; RIGÓ, J. JR.; LÁZÁR L.; BEKO, G.; MOLVAREC, A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. **BMC Immunology**, London, v. 11, p. 59, Dec., 2010.

TAMAOKI, J.; KADOTA, J.; TAKIZAWA, H. Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 117, Suppl. 9A, p. 5S-11S, Nov., 2004.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, n.2, p. 364-369, 2009.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, Nov., 2000.

TORKILDSEN, G.; TERRENCE, P.; OBRIEN, P. Conjunctival tissue pharmacokinetic properties of topical azithromycin 1% and moxifloxacin 0.5% ophthalmic solutions: a single-dose, randomized, open-label, active-controlled trial in healthy adult volunteers. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 30, n.11, p.2005-2013, Nov., 2008.

TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. IL-12 and TNF- α are costimulators of interferon gamma production by natural killers cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and IL-10 is a physiologic antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 8, p. 3725-3729, Apr., 1993.

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of 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. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 391, n.1, p. 477-480, Jan., 2010.

UNNO, A.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 57, n. 4, p. 515-518, Dec., 2008.

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. Jr.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v.139, n.2, p. 350-351, Feb., 2005.

VAN DER ENDE, A.; DU MAINE, A.; SCHWARTZ, A. L.; STROUS, G. J. Modulation of transferrin – receptor activity and recycling after induced differentiation of BeWo choriocarcinoma cells. **The Biochemical Journal**, London, v. 270, n. 2, p. 451-457, Sep., 1990.

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

VASSE, M.; PAYSANT, J.; SORIA, J.; MIRSHAHI, S. S.; VANNIER, J. P.; SORIA, C. Down-regulation of fibrinogen biosynthesis by IL-4, IL-10 and IL-13. **British journal of haematology**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 955–961, Jun., 1996.

VILUKSELA, M.; VAINIO, P. J.; TUOMINEN, R. K. Cytotoxicity of macrolide antibiotics in a cultured human liver cell line. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 38, n. 3, p. 465–473, Set., 1996.

VORBACH, H.; ARMBRUSTER, C.; ROBIBARO, B.; GRIESMACHER, A.; EL-MENYAWI, I.; DAXECKER, H.; RAAB, M.; MULLER, M. M. Endothelial cell compatibility of azithromycin and erythromycin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, n. 2, p. 407–409, Feb., 2002.

WIESNER, J.; SEEGER, F. The plastid-derived organelle of protozoan human parasites as a target of established and emerging drugs. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, London, v. 9, n. 1, p. 23-44, Feb., 2005.

WILCZYNSKI, J. R. Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. **Chemotherapy**, Basel, v. 52, n. 3, p. 107–110, Apr., 2006.

WILSON, D. C.; GROTENBREG, 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 Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 3, e1000815, Mar., 2010.

WITKIN, S. S.; LINHARES, I. M.; BONGIOVANNI, A. M.; HERWAY, C.; SKUPSKI, D. Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 145-53, Jan., 2011.

YAP, G. S.; SHAW, M. H.; LING, Y.; SHER, A. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 8, n.4, p. 1174-1178, Apr., 2006.

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

ANEXO I: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA - UFU

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. 360/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU 162/09**

Projeto Pesquisa: Efeito de antibióticos macrolídeos na expressão de moléculas de adesão em células trofoblásticas humanas infectadas por toxoplasma gondi.

Pesquisador Responsável: Eloisa Amália Vieira Ferro

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

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

O CEP/UFU lembra que:

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

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

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

Data de entrega do relatório final: Será estabelecida posteriormente.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

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

Uberlândia, 24 de julho de 2009.