

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Susceptibilidade de vilos placentários humanos infectados pelas cepas atípicas TgChBrUD1
ou TgChBrUD2 comparadas com cepas clonais RH ou ME-49 de *Toxoplasma gondii*

LARA AFFONSO DOS SANTOS

PROFA. DRA. ELOISA AMÁLIA VIEIRA FERRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

UBERLÂNDIA – MG
AGOSTO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Susceptibilidade de vilos placentários humanos infectados pelas cepas atípicas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 comparadas com cepas clonais RH ou ME-49 de *Toxoplasma gondii*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Graduanda: Lara Affonso dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Co-Orientadora: Priscila Silva Franco

UBERLÂNDIA – MG
AGOSTO - 2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro**, por ter me aceitado em seu laboratório de pesquisa desde o início da graduação, depositando em mim confiança para a realização deste projeto. Agradeço por ter sido uma professora memorável, que despertou em mim um olhar curioso sobre aquilo que é microscópico, porém essencial para o funcionamento e manutenção da vida. Muito obrigada pelos ensinamentos e principalmente por me mostrar a importância da ética de um pesquisador. Foram quatro anos de aprendizado, crescimento profissional e pessoal e admiração por você e seu trabalho.

Agradeço de todo meu coração a minha co-orientadora, **Dra. Priscila Silva Franco**, pela disponibilidade em me ajudar e me incluir em sua linha de pesquisa. Você é uma profissional de excepcional competência e sou grata pela paciência de me ensinar, aconselhar e corrigir, fazendo com que eu me tornasse uma pessoa mais capaz e contribuindo para a qualidade deste projeto. Admiro sua dedicação, proatividade e disciplina. Espero levar um pouco disso comigo tanto para a minha vida profissional, quanto para a minha vida pessoal.

Aos meus pais, que são meus exemplos de vida e meus grandes amores. Vocês sempre me incentivaram, fazendo com que eu acreditasse que, com esforço e honestidade, era possível alcançar todos os meus objetivos. Reconheço a luta de vocês para me proporcionar a melhor educação possível, permitindo que eu chegasse até aqui. Obrigada por todo cuidado e dedicação, tenho uma gratidão eterna pela confiança que depositam em mim.

À minha irmã, **Anna Luiza Affonso** e minha prima **Camila Rodrigues**, por me apoiarem em todos os momentos.

Ao meu namorado, **Marcos Siqueira**, por sua companhia, paciência, amor e cuidado. Agradeço por todo apoio e por confiar no meu potencial quando nem eu acreditava que iria conseguir.

Ao meu grande amigo e companheiro de laboratório, **Matheus Carvalho**. Você é uma pessoa incrível que sempre se disponibilizou a ajudar todos da nossa turma, e foi essencial na minha vida acadêmica. Obrigada por me reerguer quando eu desanimava e precisava de um ombro amigo e por sua parceria, tornando essa caminhada muito mais agradável.

Aos meus amigos, **Morisa Garcia, Rafaela Vilela, Júlia Gouveia, Leticia Dinatto, Guilherme Faria, Geovana Santos e Arthur Carrijo** pelo apoio e por crescerem junto comigo ao longo desses quatro anos. Vocês fizeram a minha graduação mais feliz, me proporcionando tantos momentos de descontração e aprendizado.

A aqueles que foram e ainda são companheiros de laboratório: **Rafaela José, Mayara Ribeiro, Camila Manzan, Iliana Balga, Ariane Pereira, Guilherme Souza, Pâmela Guirelli, Andressa Castro, Bellisa de Freitas, Alessandra Rossini, Caique Rocha, Angelica Gomes, Fernanda Oliveira, Deivid Batistão, Thádía Araújo, Ana Carolina Alcantara, Paula Gois, Anna Vercesi**. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para o meu aprendizado e crescimento no laboratório. Obrigada pela convivência, sugestões e por serem tão solícitos. Esse trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês.

Aos **familiares e amigos** que torceram por mim e me apoiaram durante a minha trajetória, contribuindo para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório cuja infecção pode ser grave em pacientes imunocomprometidos e em gestantes. O tratamento clássico da toxoplasmose congênita apresenta algumas limitações por provocar efeitos teratogênicos, sendo necessário estudo de drogas alternativas. As cepas de *T. gondii* possuem alta diversidade genotípica estando associado à gravidade da doença. Em Uberlândia foram descritas as cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD2, consideradas virulentas em células e modelos animais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a virulência das cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 em vilos placentários e a eficácia da azitromicina no controle da infecção. Os vilos placentários foram infectados com as cepas RH, ME-46, TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 e tratados com azitromicina, espiramicina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina. A viabilidade dos vilos placentários foi analisada pelo ensaio LDH e por análise morfológica. A carga parasitária foi determinada por qRT-PCR. Observamos maior carga parasitária nos vilos infectados com a cepa TgChBrUD1 comparados com a cepa TgChBrUD2. A viabilidade dos vilos placentários não foi alterada pelas drogas e o tratamento com azitromicina foi tão eficaz quanto o tratamento clássico da toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, cepas atípicas, azitromicina.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e formas de infecção	1
1.2 Cepas e polimorfismo genético de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.3 Toxoplasmose e Toxoplasmose Congênita	5
1.4 Tratamento da Toxoplasmose Congênita	8
1.5 Placenta	10
1.7 Vilos Placentários	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Amostras de Placenta	13
4.2 Manutenção das cepas clonais (RH e ME-49) e atípicas (TgChBrUD1 e TgChBrUD2) de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
4.3 Drogas	15
4.4 Cultura de explantes de vilos coriônicos humanos, infecção e tratamento.....	15
4.5 Análise da Viabilidade Tecidual	16
4.5.1. Análise da atividade a enzima LDH	16
4.5.2. Análise Morfológica.....	16
4.6. Extração de DNA e quantificação dos parasitos por PCR em tempo real.....	17
4.7 Análise estatística	18

5. RESULTADOS	18
5.1 Viabilidade Tecidual	18
5.2 Análise da Carga Parasitária	21
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÕES.....	30
8. REFERÊNCIAS.....	31
9. ANEXOS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii* e formas de infecção

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa e é capaz de infectar aves e mamíferos, inclusive humanos, com capacidade de se multiplicar na maioria das células dos hospedeiros (HILL; DUBEY, 2013; SARAF et al., 2017). Este parasito apresenta alta prevalência mundial e grande importância médica e veterinária. De maneira geral, a infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, porém pode causar sérios danos em hospedeiros imunocomprometidos (CENCIGOGA et al., 2011; DUBEY; JONES, 2008; YAN et al., 2016).

As formas infectantes conhecidas de *T. gondii* são: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Os taquizoítas representam a forma de multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira e são as formas predominantes na fase aguda da infecção. Nesta fase os parasitos são disseminados pelo sistema circulatório e têm a capacidade de infectar vários tecidos e órgãos (NISHIKAWA et al., 2008; SARAF et al., 2017; TENTER, 2009). Os bradizoítas representam as formas de replicação lenta do parasito e são típicos da fase crônica da infecção, os quais ficam no interior de cistos teciduais (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002). Os cistos podem ser encontrados no cérebro, nos músculos esquelético, cardíaco e região ocular (KAMERKAR; DAVIS, 2012; SKARIAH et al., 2010; YAN et al., 2016). Não havendo distúrbios no sistema imunológico, esta fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (ELSHEIKHA, 2008). Já os esporozoítas (contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos), correspondem às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito e são encontrados no meio ambiente podendo contaminar água, solos e alimentos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH et al., 2010).

Toxoplasma gondii necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida: um definitivo e um intermediário. Apenas as espécies dos gêneros *Felix* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos. Esses animais podem se contaminar ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início ao ciclo sexuado do parasito em seus epitélios intestinais (DABRITZ; CONRAD, 2010; ELMORE et al., 2010; FOROUTAN-RAD et al., 2016). Os hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) podem adquirir a infecção 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; transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (CENCI-GOGA et al., 2011; DUMETRE et al., 2008; HILL; DUBEY, 2013). Dentre elas, uma importante forma de infecção por *T. gondii* ocorre pela via transplacentária onde os taquizoítas são capazes de atravessar a barreira placentária e promover a transmissão vertical do parasito para os tecidos embrionários ou fetais (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009; WYROSDICK; SCHAEFER, 2015).

1.2. Cepas e polimorfismo genético de *Toxoplasma gondii*

Cepas de *T. gondii* estão amplamente distribuídas na natureza (DUBEY; SU, 2009; SIBLEY; AJIOKA, 2008). Estudos com análises moleculares de isolados dispersos principalmente na Europa e Estados Unidos mostraram que a maioria das cepas apresenta um padrão genético clonal e são pertencentes a um dos três genótipos designados como tipo I, II e III (DARDE, 2004; RICO-TORRES; VARGAS-VILLAVICENCIO; CORREA, 2016; SIBLEY; AJIOKA, 2008).

As cepas do tipo I (RH, BK e VEL) apresentam alta virulência. Em humanos esta cepa pode causar doenças oculares graves (COMMODARO et al., 2009; VALLOCHI et al.,

2005). As cepas do tipo II (ME-49, M3) são predominantes em isolados de pacientes com AIDS e/ou encefalite toxoplásmica. Também se relacionam aos casos de reativação da infecção crônica em humanos e infecções congênicas (AJZENBERG et al., 2002; SIBLEY et al., 2009). As cepas do tipo III (VEG, M-7741) associam-se às infecções animais, responsável por infecções brandas e assintomáticas (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY et al., 2009). Importante ressaltar que a patogenicidade de *T. gondii* está estreitamente relacionada à virulência da cepa e à espécie hospedeira, de tal maneira que é possível a ocorrência de variações na patogenicidade dessas cepas dependendo da espécie e do “status” imunológico do hospedeiro (PENA et al., 2008).

A cepa RH foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (SABIN, 1941) sendo utilizada como padrão na comparação entre cepas. Esta é considerada altamente virulenta. Em camundongos é letal com uma dose mínima de taquizoítas (DARDE, 2008; DUBEY et al., 1999).

A cepa ME-49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro em 1965. É cistogênica ou de baixa virulência (SUZUKI et al., 1988). Em camundongos, certas linhagens são mais suscetíveis que outras à infecção por *T. gondii* levando a variações da patogenicidade pelo uso da mesma cepa. Estudos utilizando o roedor *Calomys callosus* (família Cricetidae), mostraram que estes animais apresentam elevada susceptibilidade à cepa RH de *T. gondii*, ocorrendo o óbito no oitavo dia de infecção pelo inóculo de 100 taquizoítas (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998). Por outro lado, essa espécie é resistente à cepa ME-49 (PEREIRA et al; 1999).

Nos últimos anos, estudos revelaram polimorfismo genético por meio da caracterização genotípica de isolados de *T. gondii*, em amostras de diferentes espécies de animais e humanos em diferentes países (KHAN et al., 2011; PENA et al., 2008; SU et al., 2012). Pela análise PCR-RFLP (polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição) do

locus SAG2 (que codifica o antígeno de superfície p22), os isolados encontrados na América do Norte e Europa apresentam alelos típicos das cepas tipo I, II e III, sendo que a cepa predominante é do tipo II (SIBLEY et al., 2009). Porém, quando isolados oriundos de outras regiões do mundo, observou-se alta porcentagem de genótipos “atípicos” ou recombinantes, sugerindo que a população de *T. gondii* seria altamente diversa nessas regiões (DUBEY et al., 2007; SHWAB et al., 2014; SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Estes resultados corroboram com os dados apresentados por Dubey e colaboradores (2007), que demonstrou que as cepas de *T. gondii* do Brasil e Colômbia são biológica e geneticamente diferentes daquelas da América do Norte e Europa. Experimentos realizados com parasitos isolados de frangos assintomáticos do Brasil apresentaram dados de que estes parasitos são mais patogênicos para camundongos que os isolados típicos da Europa ou Estados Unidos, independente do genótipo (DUBEY et al., 2007a).

Estudos com amostras humanas mostraram alta taxa de polimorfismo genético nos isolados do parasito (FERREIRA et al., 2008). Além desses trabalhos realizados com amostras humanas no Brasil, vários estudos de genotipagem foram realizados em isolados de origem animal, como em galinhas (DUBEY et al., 2010; SOARES et al., 2011), gatos (PENA et al., 2008), porcos (FRAZÃO-TEXEIRA et al., 2011) e até mesmo animais silvestres (PENA et al., 2011). Todos os trabalhos apresentam resultados semelhantes mostrando alta diversidade genotípica dos isolados brasileiros. Acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética das cepas brasileiras de *T. gondii* (DARDE, 2008; KHAN et al., 2009).

Em um estudo realizado em Uberlândia, Minas Gerais, foram encontradas duas cepas em amostras provenientes de coração de galinhas, denominados TgChBrUD1 e TgChBrUD2. A genotipagem desses isolados mostrou que TgChBrUD1 pertence ao tipo BrII (genótipo #11 no ToxoDB PCR-RFLP) e TgChBrUD2 ao tipo BrI (genótipo #6 no ToxoDB PCR-RFLP).

Para a genotipagem dos isolados, foram utilizados doze *primers* diferentes, verificando-se que as cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 são o resultado de recombinações genéticas das três linhagens clonais de *T. gondii*, além de alelos não comuns às cepas tradicionais do parasito (LOPES et al., 2016).

1.3. Toxoplasmose e Toxoplasmose Congênita

A toxoplasmose é a protozoonose causada por *T. gondii* e é uma das zoonoses com maior difusão mundial, porém devido a diferentes hábitos culturais e higiênicos são bastante variáveis as taxas de prevalência da doença dependendo da área geográfica considerada (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). A toxoplasmose 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 infecção geralmente cursa de forma assintomática ou subclínica em cerca de 90% dos casos (CENCI-GOGA et al., 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; YAN et al., 2016).

O curso da infecção 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, mialgia, 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 (CENCI-GOGA et al., 2011; DUBEY; JONES, 2008).

A rápida disseminação dos parasitos está vinculada com a capacidade destes em infectar células migratórias do sistema imune como monócitos, linfócitos e células dendríticas (LAMBERT et al., 2006; SIBLEY, 2011). 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 imunoprivilégio (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; UNNO et al., 2008).

A forma congênita da toxoplasmose ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação, alcançando assim a circulação e os tecidos fetais (KODJIKIAN, 2010). No entanto, a transmissão congênita do parasito não é obrigatória, equivalendo de 20 a 50% dos casos de primo-infecção materna humana. 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 provoca condições clínicas mais grave podendo até 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 (FRIMPONG et al., 2017; KODJIKIAN, 2010; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A infecção congênita pode provocar graves problemas ao recém nascido, como microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardamento mental e psicomotor. Cerca de 70 a 90% dos recém nascidos são assintomáticos para a doença, porém estes podem apresentar sequelas mais tardiamente (BLANCO-LAGO et al., 2010; JONES et al., 2010).

A infecção com *T. gondii* estimula uma resposta imune do tipo Th1 com acentuada produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina-1 ($\text{IL-1}\beta$). $\text{IFN-}\gamma$ é uma potente citocina ativadora de macrófago, que quando ativados produzem óxido nítrico (NO) permitindo uma ação tóxica contra o parasito (MILLER, C. M. et al., 2009; PIFER; YAROVINSKY, 2011; SHER; TOSH; JANKOVIC, 2017).

Durante a gestação as funções fisiológicas maternas são alteradas e o sistema imune normalmente é induzido a um estado de tolerância aos antígenos fetais (KRAVETZ, 2010). Muitos hormônios, mais notavelmente estrógenos e progesterona, estão amplamente aumentados e esta condição gera alterações no balanço de citocinas de perfil Th1/Th2 (MIYAURA; IWATA, 2002). Assim, há uma tendência materna à conversão para o perfil imunológico do tipo Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, e TGF- β , as quais são sintetizadas na interface materno-fetal (DENNEY et al., 2011; MILLER, C. M. et al., 2009).

A maior susceptibilidade de gestantes à toxoplasmose pode estar relacionada à maior produção de citocinas anti-inflamatórias, que são mais expressas durante a gestação. Neste caso, observa-se uma situação de “imunossupressão”, uma vez que hormônios como estrógeno e progesterona modulam a reatividade das células T e a produção de citocinas de perfil Th2 (LANG; GROSS; LUDER, 2007; VARGAS-VILLAVICENCIO; DE LEON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2009). Assim, a influência hormonal no sistema imunológico com a produção de citocinas anti-inflamatórias para evitar a rejeição ao feto, acaba influenciando a maior susceptibilidade à infecção parasitária, e consequentemente, o risco de infecção placentária e transmissão congênita (KRAVETZ, 2010; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Na resposta imunológica, a resposta humoral é importante para o diagnóstico sorológico da doença, visto que os anticorpos desempenham um papel secundário no controle da infecção por *T. gondii* (PETERSEN, 2007; SERRANTI; BUONSENSO; VALENTINI, 2011). Anticorpos IgM podem ser encontrados após 7 dias de infecção, alcançando um título máximo em poucas semanas e declinando gradualmente. 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 (ELSHEIKHA, 2008; TALABANI et al., 2010).

Diante do risco de ocorrer a toxoplasmose congênita, a prevenção é baseada por programas de educação e saúde pública. É recomendando, principalmente às gestantes, que evitem contato com materiais potencialmente contaminados, como carnes cruas, frutas e verduras com higienização deficiente e caixas de areia com dejetos de gatos (BOJAR; SZYMANSKA, 2010).

1.4. Tratamento da Toxoplasmose Congênita

O principal tratamento para toxoplasmose congênita é a combinação de sulfadiazina e pirimetamina associadas ao ácido folínico. Essa associação de drogas é indicada para gestantes com infecção fetal confirmada após o primeiro trimestre gestacional (ALDAY; DOGGETT, 2017; RORMAN et al., 2006). Quando há suspeita de infecção aguda, porém sem confirmação de infecção fetal no primeiro trimestre de gestação, o tratamento é realizado com espiramicina (ELSHEIKHA, 2008; JONES et al., 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A combinação de pirimetamina com sulfadiazina utilizada como tratamento da toxoplasmose possui um notório efeito sinérgico contra a replicação de *T. gondii*, inibindo as enzimas dihidrofolato redutase (DHFR) e dihidrofolato sintase (DHPS), que são responsáveis pela síntese do folato pelo parasito, essenciais para sua replicação (ALDAY; DOGGETT, 2017; DOLIWA et al., 2013). A sulfadiazina funciona como um antimetabólito e só é eficaz contra as formas taquizoítas do parasito (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002). Normalmente, a administração da sulfadiazina por um longo período, é associado a efeitos colaterais na gestante, o que leva a descontinuidade do tratamento (MARTINS-DUARTE et al., 2015). O uso da pirimetamina não é indicado no primeiro trimestre de gestação devido ao seu efeito

teratogênico e está associada ao aumento de danos no tubo neural do feto (HERNANDEZ-DIAZ et al., 2001). Já a espiramicina é utilizada para diminuir as chances de transmissão vertical de *T. gondii* e minimiza a magnitude da infecção congênita. A desvantagem dessa droga está associada à sua baixa penetração nos tecidos fetais (RODRIGUES et al., 2014).

Outra droga em estudos para o tratamento da toxoplasmose congênita, testada em murinos, linhagens celulares e explantes placentários, é a azitromicina, a qual apresenta atividade inibitória prolongada sobre a replicação intracelular de taquizoítas, e é utilizada, associada à pirimetamina ou sulfadiazina como tratamento alternativo quando a combinação pirimetamina-sulfadiazina é contraindicada (ALDAY; DOGGETT, 2017; CASTRO-FILICE et al., 2014; COSTA et al., 2009; FRANCO et al., 2011).

Os antibióticos espiramicina e azitromicina pertencem ao grupo dos macrolídeos, caracterizados por possuir um anel de lactona macrocíclico que se associa com diferentes açúcares. Os macrolídeos se ligam a subunidade 50S inibindo a síntese proteica do parasito (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; PETROPOULOS et al., 2009). Macrolídeos compostos com 15 átomos de carbono no anel de lactona, como é o caso da azitromicina, apresentam propriedades anti-inflamatórias, podendo influenciar na resposta imune parasitária (FRIEDLANDER; ALBERT, 2010).

A azitromicina em comparação com outros compostos macrolídeos possui características farmacológicas melhores como a rápida difusão tecidual, tem um amplo espectro de ação e sua meia-vida biológica é mais prolongada. Além disso, tem a vantagem de ser administrada em dose única ao dia, possuindo resistência a degradação ácida no estômago e maior amplitude das propriedades terapêuticas (PETROPOULOS et al., 2009).

Em um estudo testando macrolídeos, o tratamento com azitromicina foi o único com ação prolongada contra *T. gondii*, sendo eficaz na inibição da replicação intracelular de taquizoítas (CHAMBERLAND; KIRST; CURRENT, 1991). A droga também apresentou

capacidade de reduzir significativamente a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células trofoblásticas humanas da linhagem BeWo e de controlar o parasitismo em explantes de vilos placentários humanos (CASTRO-FILICE et al., 2014; FRANCO et al., 2011). Assim, a azitromicina pode ser uma droga alternativa para o tratamento da infecção congênita por *T. gondii*, porém todos os estudos com esta droga citados anteriormente utilizaram a cepa clonal RH e não é conhecido a ação da azitromicina contra cepas atípicas.

1.5. Placenta

Para que haja sucesso na gestação é necessário que haja adequações fisiológicas no organismo materno (MICHELON et al., 2006), condicionando uma harmônica interação entre o feto e a mãe, através da interface materno-fetal representada pela placenta (RENAUD; GRAHAM, 2008).

A placenta é o órgão vital da gravidez, altamente especializado que possui inúmeras funções: permite o transporte de oxigênio, água, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais e outros nutrientes para o feto; exerce atividade endócrina e protege o feto contra moléculas estranhas, infecções e doenças maternas (DUBE et al., 2017). O processo de implantação e formação da placenta é um processo altamente coordenado envolvendo a interação entre células trofoblásticas e a mucosa uterina (BENIRSCHKE et al., 2006).

Células trofoblásticas invadem os tecidos uterinos, ligam todas as estruturas luminiais com o espaço intervilo e remodelam as artérias espiraladas da parede uterina de modo a assegurar que o feto em desenvolvimento receba o suporte de sangue necessário para supri-lo das necessidades nutritivas, gasosas e de eliminação de excretas (LOKE; KING; BURROWS, 1995; MOSER; HUPPERTZ, 2017; NORWITZ; SCHUST; FISHER, 2001).

A placenta humana é do tipo hemocorial que caracteriza pela presença de sangue materno em contato direto com as células trofoblásticas. Anatomicamente a placenta é

subdividida em duas regiões, a placa coriônica, que compreende a parte fetal da placenta e a placa basal ou decídua basal, que é a parte materna. Entre estas duas regiões está o espaço intervilloso, o qual contém a principal subunidade funcional da placenta – os vilos coriônicos e são extensamente banhados pelo sangue materno (BENIRSCHKE; KAUFMANN, 2000).

Os vilos coriônicos são compostos pelo sincitiotrofoblasto (camada de trofoblasto sincicial localizada mais externamente), citotrofoblasto e tecido conjuntivo que contém os vasos sanguíneos fetais; estas estruturas em conjunto formam a barreira placentária. A placenta é composta de vilos que flutuam no sangue materno – por isso denominados vilos flutuantes; e vilos em interação com a mucosa uterina (vilos de ancoragem) são responsáveis por ancorar a placa coriônica à placa basal ou decídua basal (GUDE et al., 2004).

1.6. Vilos placentários

Explantos de placenta humana (vilos placentários) são amplamente utilizados em estudos para a compreensão de mecanismos atuantes na interface materno-fetal, como transporte através da placenta, funções metabólicas e endócrinas (AHMED et al., 2016; MILLER, R. K. et al., 2005). Além de serem adequados nos estudos da esteroidogênese e depuração metabólica (SATO et al., 2015).

Os vilos placentários contêm inúmeros tipos celulares: células trofoblásticas, células do mesênquima fetal, células endoteliais, sanguíneas e células do sistema imunológico, portanto, mantêm o mesmo grau de organização que a arquitetura celular do tecido *in vivo* (MILLER, R. K. et al., 2005).

Sob condições adequadas, os vilos placentários de primeiro e terceiro trimestre podem permanecer viáveis em condições de cultivo por até 12 dias (MILLER, R. K. et al., 2005), sendo aplicados em estudos de infecção *ex vivo*. Tais estudos utilizam patógenos implicados na transmissão vertical de doenças, como *Trypanosoma cruzi* (LUJÁN, et al., 2004),

Plasmodium falciparum (LUCCHI; PETERSON; MOORE, 2008) e *Toxoplasma gondii* (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2011; FERRO et al., 2008).

O interesse de aplicação de explantes como modelo de estudo é crescente. A aplicação destes modelos é reflexo da habilidade da placenta em se adaptar a diferentes condições de cultura. Os avanços nestes estudos permitirão melhor entendimento dos mistérios que ainda existem para o entendimento deste órgão tão complexo (MILLER, R. K. et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que as cepas atípicas são mais virulentas comparadas com as cepas clonais e que a azitromicina pode ser uma droga alternativa para o tratamento da infecção congênita por *T. gondii* propõe-se um modelo de estudo para simular a interface materno-fetal *ex vivo* em uma situação de infecção por cepas atípicas de *T. gondii* e tratamento com azitromicina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Esse trabalho busca avaliar a virulência das cepas atípicas (TgChBrUD1 e TgChBrUD2) utilizando como controle cepas clonais (RH e ME-49) de *T. gondii* em vilos placentários humanos de terceiro trimestre e analisar a eficácia do tratamento alternativo com azitromicina no controle dessas cepas em comparação com os tratamentos clássicos de toxoplasmose congênita.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade tecidual dos vilos placentários tratados com azitromicina, espiramicina ou a combinação de sulfadiazina e pirimetamina;

- Avaliar possíveis alterações morfológicas nos vilos placentários em decorrência do tratamento com as drogas azitromicina, espiramicina ou a combinação de sulfadiazina e pirimetamina;
- Determinar a carga parasitária nos vilos placentários tratados com azitromicina, espiramicina ou a combinação de sulfadiazina e pirimetamina e infectados pelas cepas clonais e atípicas de *T.gondii*;
- Avaliar a eficácia das drogas azitromicina, espiramicina e a combinação de sulfadiazina e pirimetamina na inibição da replicação dos taquizoítas das cepas clonais e atípicas de *T.gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras de Placentas

As placentas foram coletadas de pacientes parturientes e sorologicamente saudáveis, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

Após a cesariana, as gestantes foram informadas sobre os objetivos do trabalho e após a autorização materna, comprovada pela assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO I) a placenta foi coletada para dissecação de vilos placentários. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (ANEXO II) e assim, seguidas todas as normas éticas de conduta com as pacientes.

Neste estudo só foram incluídas as gestantes voluntárias que assinaram o TCLE. As gestantes que não aceitaram participar da pesquisa e não assinaram o TCLE foram excluídas.

4.2. Manutenção das cepas clonais (RH e ME-49) e atípicas (TgChBrUD1 e TgChBrUD2) de *Toxoplasma gondii*

As cepas RH, TgChBrUD1 (UD1) e TgChBrUD2 (UD2) de *T. gondii* foram mantidas, primeiramente, na cavidade peritoneal de *Calomys callosus* por meio de repiques. Estes animais foram mantidos no laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

O exsudato peritoneal foi colhido e centrifugado a 720 x g, temperatura ambiente por 5 minutos. Os taquizoítas resultantes foram ressuspensos e lavados duas vezes em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Sigma Chemical CO. St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Brasil) e 1% de antibióticos (10.000U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina) (Cultilab, Brasil), L-glutamina, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e 2β-mercaptoetanol (Sigma Chemical CO., Brasil) e adicionado em frascos de cultura de 25cm² (Ciencor Scientific, Brasil) contendo células BeWo, mantidas em estufa 37°C e 5% de CO₂, com a finalidade de manter *in vitro* células infectadas por *T. gondii*. À medida que a maioria das células infectadas em cultura foram encontradas lisadas pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15 ml, centrifugado a 720 x g por cinco minutos em temperatura ambiente e o *pellet* ressuspensão em 1ml de meio RPMI e distribuído em dois frascos contendo células não infectadas ou foram contados em câmara hemocitométrica para infecção dos vilos placentários.

Taquizoítas da cepa ME-49 foram mantidos em cultura de células BeWo e à medida que a maioria das células infectadas foram encontradas lisadas pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15ml, centrifugado a 720 x g por cinco minutos em temperatura ambiente e o *pellet* ressuspensão em 1ml de meio RPMI e distribuído em dois frascos contendo células não infectadas ou foram contados em câmara hemocitométrica para infecção dos vilos placentários.

4.3. Drogas

Azitromicina (Biofarma, Uberlândia, Brasil), espiramicina (Sigma Chemical Co.), pirimetamina (Sigma Chemical Co.) e sulfadiazina (Sigma Chemical Co.) em pó foram reconstituídos em DMSO (solução estoque) a uma concentração de 10.000 µg/mL para azitromicina, espiramicina e sulfadiazina; e 3.000 µg/mL para pirimetamina pouco tempo antes dos procedimentos experimentais. A concentração final para cada droga foi adquirida através da diluição da solução estoque com meio de cultura. A escolha das dosagens foi realizada com base no trabalho de Castro-Filice e colaboradores (2014).

4.4. Cultura de vilos placentários, infecção e tratamento

Os tecidos placentários foram lavados em PBS gelado estéril e processados até uma hora após a coleta. O tecido foi lavado em PBS estéril e dissecado assepticamente sob estereomicroscópio para remover tecidos endometriais e membranas fetais. Vilos flutuantes com cinco a sete extremidades livres foram selecionados, como descrito por Caniggia e colaboradores (1977). Explantes (0.5 - 1.0 mg) foram transferidos para placas de cultura de 96 poços e cultivados em meio RPMI (260 µl/poço), suplementados com 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, L-glutamina (1%), aminoácidos não essenciais (1%), piruvato de sódio (1%) e Soro Fetal Bovino (10%).

Os vilos foram incubados a 37 °C em estufa de CO₂. Posteriormente eles foram infectados ou não com taquizoítas das cepas clonais RH ou ME-49 e com taquizoítas das cepas atípicas TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *T. gondii* na concentração de 1x10⁶ parasitos/poço. Após 24 horas de infecção, os vilos foram lavados e tratados com azitromicina (AZ) (1000 µg/mL) ou espiramicina (ESP) (1000 µg/mL) ou com a combinação de pirimetamina (200µg/mL) e sulfadiazina (150 µg/mL) (SP). Vilos não infectados e não

tratados serviram de controle e receberam apenas meio de cultura. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para análise da atividade da enzima LDH e os vilos placentários foram coletados para análise morfológica e determinação do parasitismo.

4.5. Análise da Viabilidade Tecidual

4.5.1. Análise da atividade da enzima LDH

Explantos placentários foram cultivados em placas de cultura de 96 poços. Após tratamento, conforme descrito anteriormente, os sobrenadantes foram coletados para se determinar a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), que foi verificada usando-se um kit comercial para diagnóstico, de acordo com as instruções do fabricante (LDH Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) e expressa em U/mL. O fundamento do teste baseia-se na mensuração da redução de NAD a NADH pela LDH (enzima citosólica, liberada para o meio extracelular quando a integridade da membrana é afetada). Danos teciduais elevam os níveis de LDH, ocorrendo perda de integridade da membrana, e quanto maiores os danos, maior o sinal espectrofotométrico. Se não houver dano à membrana, a LDH continuará intracelularmente, não ocorrendo reação.

4.5.2. Análise morfológica

Além da viabilidade pelo ensaio de LDH, a integridade dos vilos placentários foi verificada pela análise morfológica. Os vilos foram infectados e tratados como descrito acima e fixados em formol 10%. Posteriormente os tecidos foram desidratados em álcoois com concentrações crescentes e embebidos em parafina. Em seguida, cortes com 5µm foram realizados em micrótomo e subsequentemente colocados em lâminas de vidro para a análise morfológica através da coloração por hematoxilina e eosina. Nos vilos placentários, foram

observados, em microscópio óptico, os aspectos morfológicos da interface materno-fetal, compreendendo, portanto, sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e mesênquima.

4.6. Extração de DNA e quantificação dos parasitos por PCR em tempo real

O DNA dos parasitos presentes nos vilos placentários foi extraído pelo Kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) conforme instruções do fabricante. Os tecidos foram macerados através de congelamento utilizando N₂(l) e o peso normalizado para 20 mg. A quantidade de DNA total extraído foi determinada por absorbâncias em NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer) no comprimento de onda 260 e 280 nm. O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras em DO (densidade ótica) 260/DO 280 nm que deve apresentar valores entre 1,8 e 2,0.

A carga parasitária foi determinada por qRT-PCR utilizando StepOnePlus® *Real Time PCR System* (Applied Biosystems) com corante fluorescente de ligação ao DNA do Kit *Go Taq® qPCR Master Mix* (Promega®). As condições de termociclagem bem como os oligonucleotídeos foram descritos por Wahab e colaboradores em 2010. Os *primers* a serem utilizados para amplificação do DNA foram correspondentes ao gene repetitivo de 529 pares de base: forward, 5'-CACAGAAGGGACAGAAGT-3' e reverse, 5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3'. Taquizoítas da cepa RH foram utilizados como controle positivo da reação, e amostras de placentas não infectadas como controle negativo. Os dados foram analisados usando o software *Data Analysis and Technical Graphics* (Origin version 6.0; Microcal Software, Inc., Northampton, MA).

Após a determinação da carga parasitária, foram realizados os cálculos para se avaliar a eficácia de cada tratamento na inibição da replicação do parasito separadamente, comparando a eficácia das drogas azitromicina (AZ), espiromicina (ESP) e combinação de pirimetamina e sulfadiazina (SP) nos vilos infectados com a cepa RH, ME-49, TgChBrUD1

(UD1) ou TgChBrUD2 (UD2). Para isso, foi utilizada a média do índice de replicação intracelular do parasito de cada cepa não tratada (controle). Primeiramente, o valor do índice de replicação parasitária da cepa tratada com AZ, ESP ou SP foi subtraído pelo índice de replicação parasitária do controle. Depois, foi feita uma regra de três, onde, a média do índice de replicação intracelular do parasito equivalia 100% e o resultado da subtração realizada anteriormente equivalia a X, achando assim, a porcentagem de inibição do parasito.

4.7. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software Graph Pad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais. Diferenças entre os grupos na análise de carga parasitária, e dos vilos submetidos a diferentes tratamentos foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA One-Way utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade Tecidual

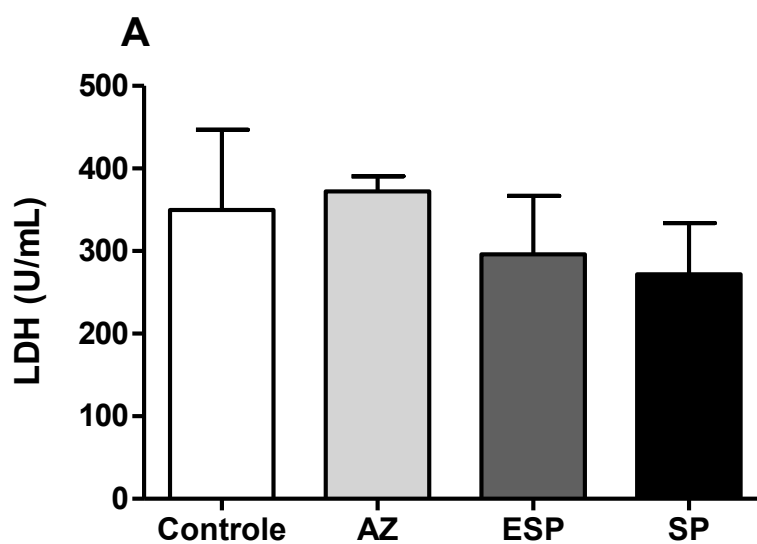
A viabilidade dos vilos placentários tratados com a AZ ou ESP ou SP foi analisada através da mensuração da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e pela análise morfológica.

Não foi observada diferença estatística na atividade da enzima LDH produzida pelos vilos tratados com AZ ou ESP ou SP comparados com o controle não tratado (**Figura 1A**).

Pela análise morfológica verificou-se que o tratamento com qualquer uma das drogas não induziu alterações morfológicas nesses vilos (**Figura 1B-E**). Nas imagens é possível a

visualização da integridade do sinciciotrofoblasto externamente cobrindo as vilosidades coriônicas (setas) e o tecido mesenquimal (M) (**Figura 1B-E**).

Figura 1



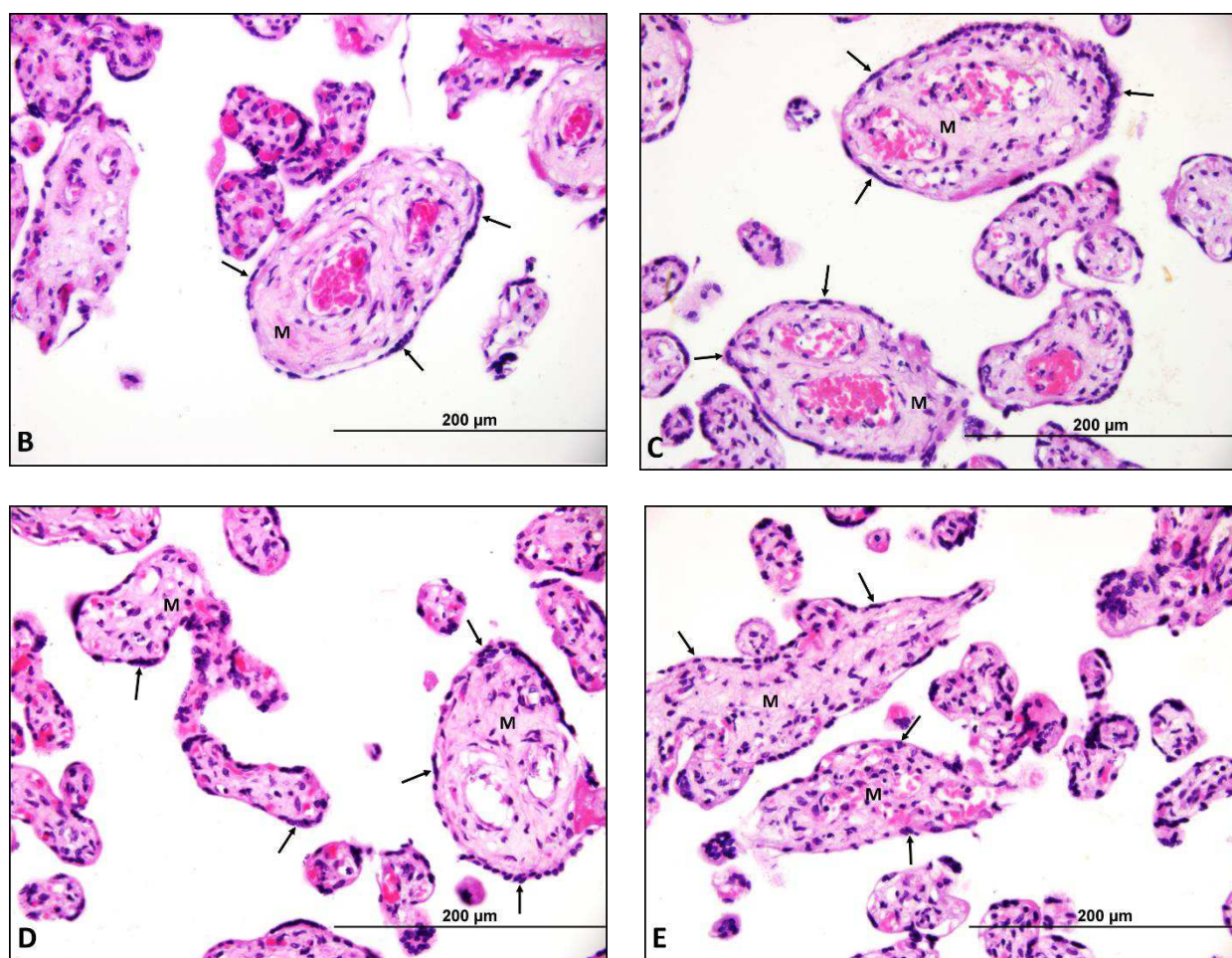


Figura 1. Análise da viabilidade tecidual dos vilos placentários tratados com azitromicina (AZ), espiramicina (ESP) ou com a combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SP). Vilos não tratados foram utilizados como controles do experimento. (A) Os sobrenadantes dos vilos foram coletados e a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi mensurada usando-se o Kit LDH *Liquiform* e expressa em U/mL (One-way ANOVA, $p < 0,05$). Os vilos foram coletados submetidos à coloração de hematoxilina e eosina para análise morfológica. Fotomicrografias representativas de vilos placentários não tratados (B), tratados com azitromicina (C), espiramicina (D) ou combinação de sulfadiazina e pirimetamina (E). Setas demonstram o sinciciotrofoblasto e M o tecido mesenquimal.

5.2. Análise da Carga Parasitária

A carga parasitária referente às cepas RH, ME-49, TgChBrUD1 (UD1) e TgChBrUD2 (UD2) de *T. gondii* em vilos placentários após tratamento com AZ, ESP e SP foi determinada por qRT-PCR.

Nos vilos não tratados e infectados (Controle), observou-se maior carga parasitária nos vilos infectados com a cepa UD1 comparados com os vilos infectados com a cepa RH ou ME-49 ou UD2. Não foi observada diferença significativa no parasitismo entre os vilos infectados com a cepa RH, ME-49 e UD2 (**Figura 2A-C**).

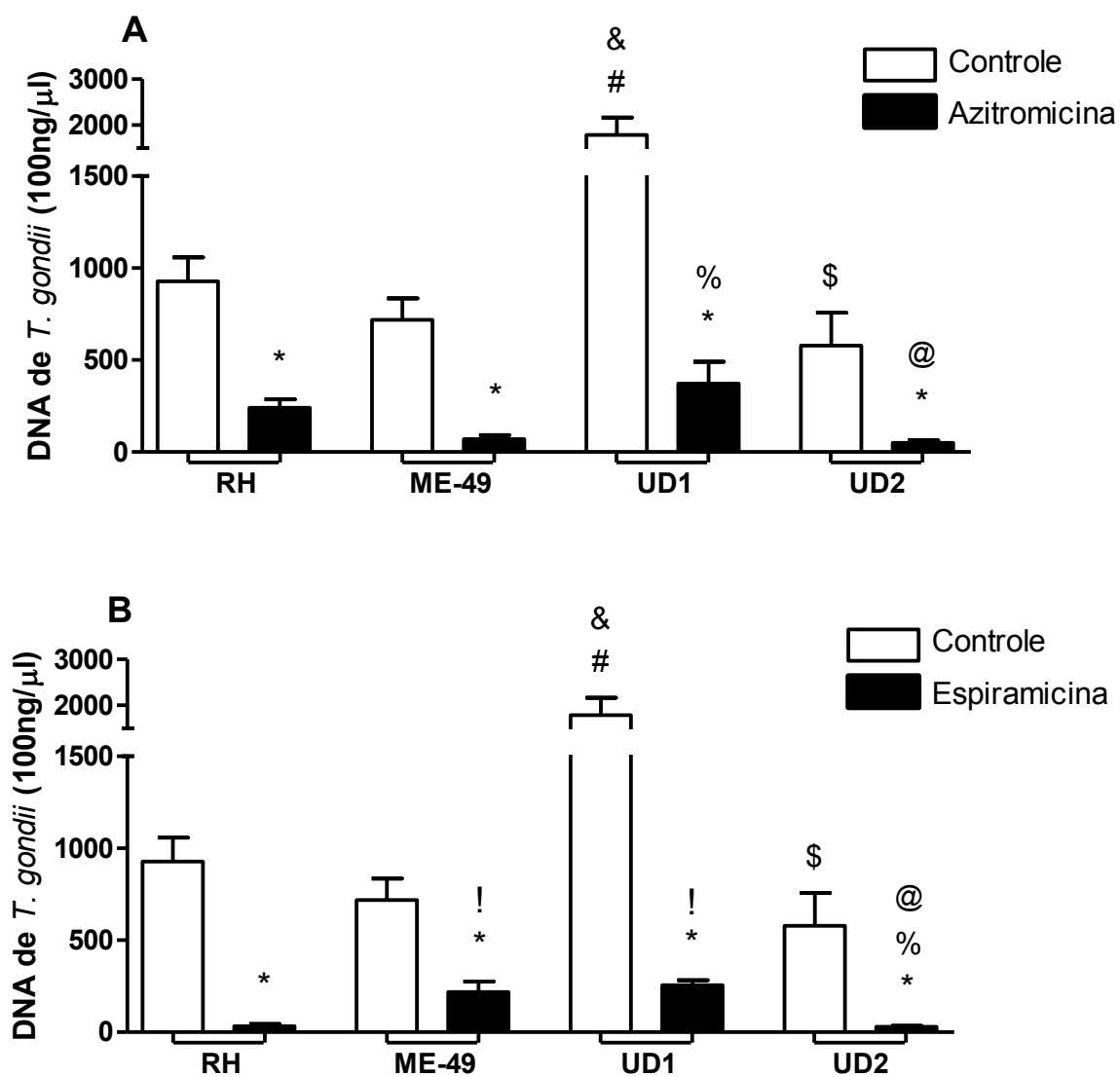
A análise do parasitismo nos vilos tratados (Tratados) mostrou que, independente da cepa e do tratamento, houve diminuição significativa da carga parasitária comparados com os vilos infectados e não-tratados (Controle) ($p < 0,05$) (**Figura 2A-C**).

No tratamento com AZ, a carga parasitária nos vilos infectados com a cepa UD1 foi maior comparada com a carga parasitária dos vilos infectados com a cepa ME-49 ou UD2 (**Figura 2A**). No tratamento com ESP, a carga parasitária nos vilos infectados com a cepa UD1 ou ME-49 foi maior comparada com a carga parasitária dos vilos infectados com a cepa RH (**Figura 2B**). A carga parasitária nos vilos infectados com a cepa UD2 foi menor comparada com a carga parasitária dos vilos infectados com a cepa ME-49 ou UD1. Já no tratamento com SP a carga parasitária nos vilos infectados com as diferentes cepas foi controlada, sem diferenças significativas quando comparadas (**Figura 2B**).

A eficácia das drogas na inibição da replicação dos taquizoítas das cepas RH, ME-49, UD1 e UD2 foi representado na **Tabela 1**. Nos vilos infectados que receberam o tratamento, independentemente da cepa e droga utilizada, observou-se menor índice de replicação intracelular dos taquizoítas quando comparado com os vilos infectados e não tratados (**Tabela 1**). A comparação entre os tratamentos em vilos infectados com a mesma cepa mostrou que

não houve diferença significativa na taxa de inibição do parasito para nenhuma das cepas utilizada (**Tabela 1**).

Figura 2



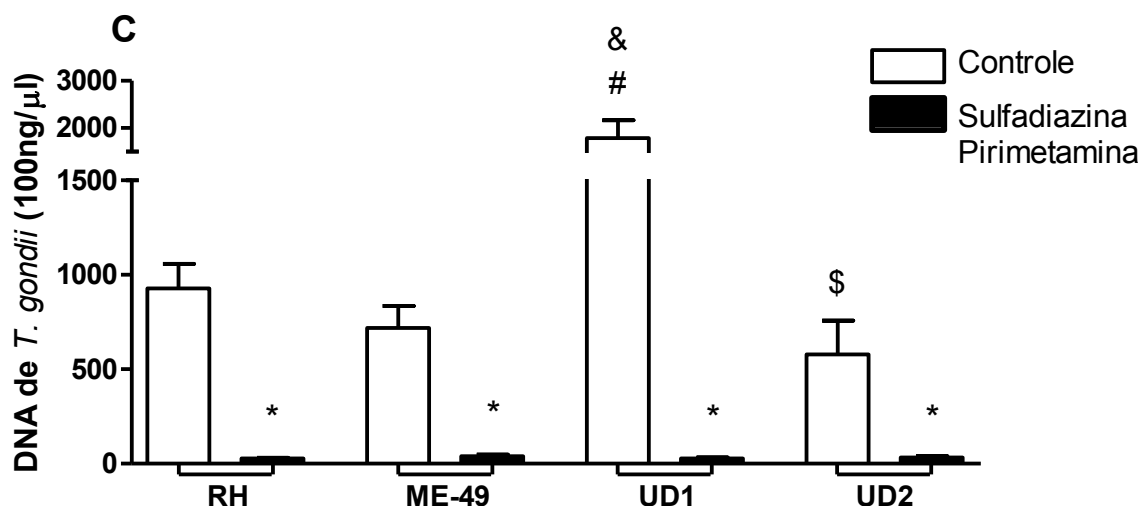


Figura 2. Análise da carga parasitária em vilos placentários infectados e tratados com azitromicina (AZ), espiramicina (ESP) ou com a combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SP). Vilos não tratados foram utilizados como controles do experimento. A carga parasitária foi determinada por qRT-PCR utilizando StepOnePlus® *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Análise da carga parasitária de vilos tratados com azitromicina (A), espiramicina (B) ou com a combinação de sulfadiazina e pirimetamina (C). Símbolos comparando os vilos infectados e não tratados (Controle): (#) comparação entre RH e ME-49 ou UD1 ou UD2, (&) comparação entre ME-49 e UD1 ou UD2, (\$) comparação entre UD1 e UD2. Símbolos comparando os vilos infectados e tratados (Tratados): (!) comparação entre RH e ME-49 ou UD1 ou UD2, (%) comparação entre ME-49 e UD1 ou UD2, (@) comparação entre UD1 e UD2. (One-way ANOVA, teste de comparação múltipla de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 1. Inibição da replicação de *T. gondii* da cepa RH, ME-49, TgChBrUD1 (UD1) e TgChBrUD2 (UD2) em vilos placentários tratados com azitromicina (AZ), espiramicina (ESP) ou a combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SP). A tabela foi feita a partir dos resultados obtidos por qRT-PCR.

Cepa/Droga	Índice de replicação intracelular ^a	Inibição do parasito (%)
RH/sem tratamento	927.9 ± 344.7	-
RH/AZ	241.1 ± 90.69*	74
RH/ESP	181.4 ± 168.7*	80
RH/SP	40,33 ± 25.58*	96
ME-49/sem tratamento	705.4 ± 285.4	-
ME-49/AZ	166.0 ± 164.7*	76
ME-49/ESP	136,2 ± 110.7*	81
ME-49/SP	35.75 ± 16.50*	95
UD1/sem tratamento	2095.0 ± 608.9	-
UD1/AZ	197.0 ± 232.1*	91
UD1/ESP	135.9 ± 135.6*	94
UD1/SP	21.45 ± 13.18*	99
UD2/ sem tratamento	404.7± 226.4	-
UD2/AZ	42.50 ± 24.92*	89
UD2/ESP	26.53 ± 10.89*	93
UD2/SP	29.14 ± 16.13*	93

^a Índice de replicação intracelular foi expresso em média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos em triplicata.

* Diferença estatisticamente significante em relação ao controle ($p < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

Estudos moleculares de cepas de *T. gondii* isolados na América do Sul mostraram alta frequência de genótipos atípicos, sugerindo um alto nível de diversidade deste parasito nesta região (SU; ZHANG; DUBEY, 2006). Alguns estudos sugerem que muitas cepas atípicas diferem em patogenicidade e transmissibilidade das cepas clonais (CARME et al., 2009; DARDE, 2008; LINDSAY; DUBEY, 2011), uma vez que a toxoplasmose congênita é mais prevalente na América do Sul quando comparada à Europa e é frequentemente associada a sintomas mais graves (CARNEIRO et al., 2013; GILBERT, R. E. et al., 2008).

As cepas TgChBrUD1 (UD1) e TgChBrUD2 (UD2) pertencem ao perfil de genótipo não clonal (genótipo #11 e genótipo #6, respectivamente) e foram descritas em amostras de coração e cérebro de frangos na cidade de Uberlândia (LOPES et al., 2016). Além disso, esses genótipos foram encontrados em outros animais, como cães, gatos e humanos em diferentes regiões geográficas do país (CARNEIRO et al., 2013; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008; SILVA et al., 2014), sugerindo que *T. gondii* pode compartilhar os mesmos hospedeiros ao infectar animais e humanos.

A resposta imune contra *T. gondii* envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ . Além disso, induz a polarização de macrófagos tipo M1, incluindo a ativação dos genes responsáveis pela produção de NO e IL-6 (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; JEBBARI et al., 1998; MEIRA et al., 2014). Pelo fato de existir diferenças na virulência para cada cepa de *T. gondii*, alguns estudos mostraram que pode haver uma resposta imunológica particular para cada cepa (GLASER; HAGOS; MOLESTINA, 2011; ROSOWSKI et al., 2011; SAEIJ et al., 2007; XIAO et al., 2011). Aliado a esses estudos, a eficácia do tratamento na América do Norte e na Europa pode não ser a mesma em que predominam linhagens mais virulentas de genótipos atípicos (GILBERT, R., 2009). Assim, no presente estudo foi avaliada a virulência das cepas atípicas UD1 e UD2 de *T. gondii* em vilos

de terceiro trimestre e a eficácia do tratamento com azitromicina no controle destas cepas em comparação com os tratamentos clássicos de toxoplasmose congênita.

Células e animais já foram utilizados como modelos experimentais para avaliar a virulência das cepas atípicas UD1 e UD2 (RIBEIRO, 2013; FRANCO et al., 2014). Estudos com células trofoblásticas da linhagem BeWo infectadas com as cepas UD1 ou UD2 mostraram que este tipo celular é mais susceptível à infecção pela cepa UD1 do que pela cepa UD2 (RIBEIRO et al., 2013). Os parasitos da cepa UD1 replicam mais lentamente no interior de células fibroblásticas da linhagem HFF, enquanto os parasitos da cepa UD2 são capazes de replicar e romper as células hospedeiras em menor intervalo de tempo (LOPES et al., 2016). Em *Calomys callosus* tanto os machos, como as fêmeas foram suscetíveis à infecção pelas cepas UD1 e UD2. A mortalidade destes animais foi observada após 9 dias de infecção e as fêmeas infectadas com UD2 apresentaram maior carga parasitária quando comparadas com as fêmeas infectadas com UD1 (FRANCO et al., 2014). Por outro lado, a infecção pela cepa UD2 causou mais danos gestacionais comparada com a infecção por UD1.

No presente estudo, os vilos placentários infectados com a cepa UD1 apresentaram maior carga parasitária comparados com os vilos placentários infectados com a cepa RH ou ME-49 ou UD2. Desta forma, as cepas atípicas UD1 e UD2 manifestaram diferentes graus de virulência dependendo do modelo experimental avaliado. Estes resultados sugerem que, embora os polimorfismos nos alelos de fragmentos de DNA propostos por Su et al. (2010) elucidem os aspectos da epidemiologia molecular de *T. gondii*, eles acabam subestimando a diversidade biológica das cepas. Enquanto UD1 possui cinco marcadores genéticos da cepa tipo I, dois para tipo II e cinco para tipo III, UD2 apresenta nove marcadores para o tipo I, um para tipo II e um para tipo III, além de um alelo atípico daqueles encontrados nos tipos I, II e III do parasito, denominado c22-8. (LOPES et al., 2016). Por causa destas características genotípicas era esperado que a cepa UD2 apresentasse maior virulência comparada com a

cepa UD1, porém isso não foi demonstrado em vilos placentários de terceiro trimestre. Interessantemente, como citado acima, Ribeiro e colaboradores (2013) observaram que a cepa UD1 é mais virulenta que a cepa UD2 em células BeWo. Assim, em modelos experimentais que simulam a interface materno-fetal a cepa UD1 se mostra mais virulenta.

O tratamento clássico da toxoplasmose congênita é baseado na combinação de pirimetamina e sulfadiazina ao ácido folínico nos casos de infecção fetal confirmada. A espiramicina é administrada quando ainda não há infecção fetal (ALDAY; DOGETT, 2017; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). As drogas utilizadas no tratamento da toxoplasmose congênita são eficazes no controle da infecção, porém apresentam toxicidade elevada, induzem efeitos teratogênicos e desencadeiam efeitos colaterais prejudiciais (KAYE, 2011; MONTOYA; REMINGTON, 2008). Além disso, a resistência às drogas por *T. gondii* contribui para falhas no tratamento, uma vez que uma mutação no gene dihidropteroate sintase (DHPS) conhecida por conferir resistência tanto em *T. gondii* quanto *P. falciparum* demonstrou ser capaz de gerar resistência cruzada a várias sulfonamidas incluindo sulfadiazina (WATTS et al., 2015).

A pirimetamina inibe a biossíntese dos ácidos nucleicos, pode ser altamente tóxico por interagir de maneira indistinta com os processos bioquímicos do parasito e também do hospedeiro. Sua utilização no primeiro trimestre da gestação tem sido associada com a supressão da medula óssea e a defeitos no tubo neural (CHENE; THIEBAUT, 2009; HERNANDEZ-DIAZ et al., 2001). A espiramicina é importante na prevenção da transmissão de *T. gondii* durante o primeiro trimestre gestacional, porém apresenta desvantagem por sua baixa penetração nos tecidos fetais (RODRIGUES et al., 2014). Nesse sentido, faz se necessário o estudo de tratamentos alternativos para toxoplasmose congênita que possuam maior eficácia e minimizem danos toxicológicos tanto para a mãe quanto para o feto. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram o controle da infecção e replicação de *T. gondii* em

células BeWo e THP-1 tratadas com azitromicina e o potente efeito desse tratamento alternativo na redução da taxa de proliferação de *T. gondii* (cepa RH) em vilos placentários de terceiro trimestre (CASTRO-FILICE et al., 2014; FRANCO et al., 2011). Assim, no presente estudo foi investigada a eficácia da AZ no controle das cepas atípicas em comparação com a terapia tradicional.

A escolha das drogas e suas dosagens foi realizada com base no estudo de Castro-Filice e colaboradores (2014) que utilizaram azitromicina e os tratamentos clássicos em vilos placentários de terceiro trimestre e contra *T. gondii*. Desta forma, os vilos placentários foram tratados com azitromicina (AZ) (1000 µg/mL) ou espiramicina (ESP) (1000 µg/mL) ou com a combinação de pirimetamina (200µg/mL) e sulfadiazina (SP) (150 µg/mL) e submetidos aos ensaios de viabilidade. Inicialmente, nós analisamos a viabilidade dos vilos placentários tratados com AZ ou ESP ou SP através da mensuração da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e, posteriormente, pela análise morfológica. Como previsto, os resultados obtidos demonstraram que a viabilidade foi mantida em todos os tratamentos, não apresentando toxicidade aos vilos placentários. No ensaio de LDH não houve alteração no nível da enzima após os tratamentos e pela análise morfológica foi possível observar a integridade estrutural dos vilos placentários, apresentando os aspectos morfológicos da interface materno-fetal (sinciotrofoblasto e tecido mesenquimal) bem preservados.

Pela análise do parasitismo po qRT-PCR foi possível observar a eficácia das drogas no controle da infecção com as diferentes cepas. Foi visto que, na análise do parasitismo dos vilos placentários infectados e tratados, independente do tratamento e da cepa, a carga parasitária foi reduzida em comparação com os vilos placentários não tratados. Além disso, não foi observado diferenças na taxa de inibição da replicação dos taquizoítas das cepas RH, ME-49, UD1 e UD2 em vilos placentários, independentemente do tratamento. Quando comparados os diferentes tratamentos em vilos placentários infectados com a mesma cepa,

não observou-se diferença significativa na taxa de inibição do parasito. No entanto, vilos placentários infectados com a cepa UD1 apresentaram maior carga parasitária comparados com vilos placentários infectados com as outras cepas após o tratamento com AZ. No tratamento com ESP, os vilos placentários infectados com a cepa ME-49 ou UD1 apresentaram maior carga de parasitária em comparação com vilos placentários infectados com a cepa RH ou UD2.

Azitromicina e espiramicina pertencem a uma classe de antimicrobianos chamados macrolídeos. Esses fármacos se ligam a subunidade maior do ribossomo do patógeno, resultando na inibição do processo de tradução e, consequentemente, no fim da síntese de proteínas (MANKIN, 2008; STEEL et al., 2012). Macrolídeos apresentam papel fundamental no tratamento de doenças infecciosas (MIN; JANG, 2012) e se tratando de toxoplasmose congênita foi visto que azitromicina e espiramicina não são prejudiciais à gestação, pois induzem uma resposta anti-inflamatória e, ao mesmo tempo, agem diretamente contra o parasito (FRANCO et al., 2011).

Estudos mostraram que a azitromicina foi o macrolídeo que apresentou maior eficácia contra *T. gondii* em ensaios *in vitro* (CHAMBERLAND et al., 1991) e que a droga possui numerosas vantagens farmacocinéticas, além de apresentar menores índices de efeitos colaterais significativos (KORZENIOWSKI, 1995; SALMAN et al., 2010). Outro fator positivo no uso dessa droga é a sua capacidade de atuar tanto na fase crônica quanto na fase aguda da toxoplasmose (BURGESS; HASTINGS; HORAN, 1999). No presente estudo foi observado que a azitromicina é tão eficiente quanto às drogas tradicionais no controle da infecção por cepas atípicas de *T. gondii*, sugerindo mais uma vez que esta droga pode ser utilizada como tratamento alternativo da toxoplasmose congênita.

Estudos do nosso grupo demonstraram a relação entre a modulação da apoptose durante a infecção por *T. gondii* e as características de virulência do parasito. Observou-se

que a incidência de apoptose em células BeWo foi modulada diferencialmente por cepas altamente (RH) ou moderadamente (ME49) virulentas de *T. gondii*, uma vez que as células BeWo infectadas com RH apresentaram menor incidência de apoptose e maior produção de citocinas anti-inflamatórias em comparação com a cepa ME-49 (ANGELONI et al., 2013; ANGELONI et al., 2009). Desta forma, podemos supor que as cepas altamente (RH e TgChBrUD2) ou moderadamente (ME-49 e TgChBrUD1) virulentas podem modular, diferentemente, importantes mecanismos de defesa do hospedeiro para manter sua sobrevivência intracelular.

Com o presente estudo foi possível concluir que a cepa UD1 foi mais virulenta comparada com a cepa UD2 em vilos placentários. Além disso, nossos resultados demonstraram que a azitromicina foi tão eficaz quanto o tratamento clássico da toxoplasmose congênita, sendo capaz de controlar a infecção de cepas atípicas de *T. gondii* que apresentam maior virulência, atuando diretamente na proliferação do parasito. Estudos avaliando a produção de citocinas, apoptose e vias de sinalização em vilos placentários são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos associados à infecção por diferentes cepas de *T. gondii* durante a gestação.

7. CONCLUSÕES

- A viabilidade dos vilos placentários tratados com azitromicina, espiramicina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina foi mantida, não apresentando toxicidade;
- A integridade morfológica dos vilos placentários foi preservada após os tratamentos;
- Os vilos placentários infectados com a cepa UD1 mostraram maior carga parasitária comparados aos vilos placentários infectados com a cepa RH, ME-49 ou UD2;
- A azitromicina foi tão eficaz quanto a espiramicina e a combinação de sulfadiazina e pirimetamina na inibição da replicação dos taquizoítas das cepas atípicas de *T. gondii*.

8. REFERÊNCIAS

- AHMED, T. et al. Effect of folic acid on human trophoblast health and function in vitro. **Placenta**, v. 37, p. 7-15, Jan 2016.
- AJZENBERG, D. et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **J Infect Dis**, v. 186, n. 5, p. 684-9, Sep 01 2002.
- ALDAY, P. H.; DOGGETT, J. S. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. **Drug Des Devel Ther**, v. 11, p. 273-293, 2017.
- ANGELONI, M. B. et al. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 973-82, Nov 2013.
- ANGELONI, M. B. et al. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, v. 30, n. 9, p. 785-91, Sep 2009.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 9, p. 426-30, Sep 2003.
- BLANCO-LAGO, R. et al. [Congenital toxoplasmosis and cortical development malformation: an infrequent association]. **Rev Neurol**, v. 50, n. 4, p. 253-4, Feb 16-28 2010.
- BOJAR, I.; SZYMANSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. **Ann Agric Environ Med**, v. 17, n. 2, p. 209-14, 2010.
- BOSCH-DRIESSEN, L. H. et al. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**, v. 134, n. 1, p. 34-40, Jul 2002.
- BURGESS, D. S.; HASTINGS, R. W.; HORAN, J. L. A time-kill evaluation of clarithromycin and azithromycin against two extracellular pathogens and the development of resistance. **Ann Pharmacother**, v. 33, n. 12, p. 1262-5, Dec 1999.
- CARME, B. et al. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 656-8, Apr 2009.
- CARNEIRO, A. C. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 901-7, Mar 2013.

CASTRO-FILICE, L. S. et al. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **J Transl Med**, v. 12, p. 132, May 19 2014.

CENCI-GOGA, B. T. et al. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 7, p. 751-62, Jul 2011.

CHAMBERLAND, S.; KIRST, H. A.; CURRENT, W. L. Comparative activity of macrolides against *Toxoplasma gondii* demonstrating utility of an in vitro microassay. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 5, p. 903-9, May 1991.

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

COMMODARO, A. G. et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 345-50, Mar 2009.

COSTA, I. N. et al. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, v. 30, n. 10, p. 884-90, Oct 2009.

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 34-52, Feb 2010.

DARDE, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.

_____. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 366-71, Sep 2008.

DE OLIVEIRA GOMES, A. et al. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol**, v. 178, n. 6, p. 2792-801, Jun 2011.

DENNEY, J. M. et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 170-7, Feb 2011.

DOLIWA, C. et al. Induction of sulfadiazine resistance in vitro in *Toxoplasma gondii*. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 131-6, Feb 2013.

DUBE, C. et al. A role for maternally derived myokines to optimize placental function and fetal growth across gestation. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 42, n. 5, p. 459-469, May 2017.

DUBEY, J. P. et al. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 11, p. 1559-65, Oct 2007.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 11, p. 1257-78, Sep 2008.

DUBEY, J. P. et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **J Parasitol**, v. 96, n. 4, p. 709-12, Aug 2010.

DUBEY, J. P. et al. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. **J Parasitol**, v. 85, n. 4, p. 657-62, Aug 1999.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190-5, Mar 2009.

DUMETRE, A. et al. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Vet Parasitol**, v. 153, n. 3-4, p. 209-13, May 31 2008.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A. et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **J Infect Dis**, v. 199, n. 2, p. 280-5, Jan 15 2009.

ELMORE, S. A. et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 4, p. 190-6, Apr 2010.

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

FAVORETO-JUNIOR, S. et al. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 103-7, Jan-Feb 1998.

FERREIRA, I. M. et al. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 2, p. 221-7, Feb 2008.

FERRO, E. A. et al. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **Am J Pathol**, v. 172, n. 1, p. 50-8, Jan 2008.

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

FOROUTAN-RAD, M. et al. Toxoplasmosis in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Transfus Med Rev**, v. 30, n. 3, p. 116-22, Jul 2016.

FRANCO, P. S. et al. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 838-44, Nov 2011.

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

FRIMPONG, C. et al. Seroprevalence and determinants of toxoplasmosis in pregnant women attending antenatal clinic at the university teaching hospital, Lusaka, Zambia. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 10, Jan 05 2017.

GILBERT, R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 305-11, Mar 2009.

GILBERT, R. E. et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 8, p. e277, Aug 13 2008.

GLASER, K. C.; HAGOS, B.; MOLESTINA, R. E. Effects of *Toxoplasma gondii* genotype and absence of host MAL/Myd88 on the temporal regulation of gene expression in infected microglial cells. **Exp Parasitol**, v. 129, n. 4, p. 409-13, Dec 2011.

GUDE, N. M. et al. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb Res**, v. 114, n. 5-6, p. 397-407, 2004.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin Exp Med**, v. 3, n. 2, p. 84-105, Sep 2003.

HERNANDEZ-DIAZ, S. et al. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 10, p. 961-8, May 15 2001.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 2, p. 107-13, Feb 2013.

JEBBARI, H. et al. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol**, v. 20, n. 5, p. 231-9, May 1998.

JONES, J. L. et al. Toxoplasmosis prevention and testing in pregnancy, survey of obstetrician-gynaecologists. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 27-33, Feb 2010.

JONES, J. L. et al. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 56, n. 5, p. 296-305, May 2001.

KAMERKAR, S.; DAVIS, P. H. Toxoplasma on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 589295, 2012.

KAYE, A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. **J Pediatr Health Care**, v. 25, n. 6, p. 355-64, Nov-Dec 2011.

KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical Toxoplasma gondii strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 6, p. 645-55, May 2011.

KIM, K.; WEISS, L. M. Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 3, p. 423-32, Mar 09 2004.

KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **J Fr Ophtalmol**, v. 33, n. 5, p. 362-7, May 2010.

KORZENIOWSKI, O. M. Antibacterial agents in pregnancy. **Infect Dis Clin North Am**, v. 9, n. 3, p. 639-51, Sep 1995.

KRAVETZ, J. Congenital toxoplasmosis. **BMJ Clin Evid**, v. 2010, Jun 28 2010.

LAMBERT, H. et al. Induction of dendritic cell migration upon Toxoplasma gondii infection potentiates parasite dissemination. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 10, p. 1611-23, Oct 2006.

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

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Toxoplasma gondii: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1829-31, Dec 2011.

LOKE, Y. W.; KING, A.; BURROWS, T. D. Decidua in human implantation. **Hum Reprod**, v. 10 Suppl 2, p. 14-21, Dec 1995.

LOPES, C. S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of two Toxoplasma gondii isolates in free-range chickens from Uberlandia, Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 144, n. 9, p. 1865-75, Jul 2016.

LUCCHI, N. W.; PETERSON, D. S.; MOORE, J. M. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by Plasmodium falciparum. **Malar J**, v. 7, p. 42, Feb 29 2008.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 5, p. 198-201, May 2002.

MANKIN, A. S. Macrolide myths. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 414-21, Oct 2008.

MARTINS-DUARTE, E. S. et al. Ciprofloxacin Derivatives Affect Parasite Cell Division and Increase the Survival of Mice Infected with *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125705, 2015.

MEIRA, C. S. et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 levels. **Front Microbiol**, v. 5, p. 492, 2014.

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 1, p. 23-39, Jan 2009.

MILLER, R. K. et al. Human placental explants in culture: approaches and assessments. **Placenta**, v. 26, n. 6, p. 439-48, Jul 2005.

MIN, J. Y.; JANG, Y. J. Macrolide therapy in respiratory viral infections. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 649570, 2012.

MIYAURA, H.; IWATA, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **J Immunol**, v. 168, n. 3, p. 1087-94, Feb 01 2002.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, Jun 12 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 4, p. 554-66, Aug 15 2008.

MOSER, G.; HUPPERTZ, B. Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking. **Placenta**, Feb 08 2017.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 269-85, Mar 2011.

NISHIKAWA, Y. et al. Construction of *Toxoplasma gondii* bradyzoite expressing the green fluorescent protein. **Parasitol Int**, v. 57, n. 2, p. 219-22, Jun 2008.

NORWITZ, E. R.; SCHUST, D. J.; FISHER, S. J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med**, v. 345, n. 19, p. 1400-8, Nov 08 2001.

PENA, H. F. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 5, p. 561-9, Apr 2008.

PENA, H. F. et al. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 175, n. 3-4, p. 377-81, Feb 10 2011.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 12, n. 3, p. 214-23, Jun 2007.

PETROPOULOS, A. D. et al. Time-resolved binding of azithromycin to Escherichia coli ribosomes. **J Mol Biol**, v. 385, n. 4, p. 1179-92, Jan 30 2009.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to Toxoplasma gondii in mice and humans. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 388-93, Sep 2011.

RENAUD, S. J.; GRAHAM, C. H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. **Immunol Invest**, v. 37, n. 5, p. 535-64, 2008.

RICO-TORRES, C. P.; VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; CORREA, D. Is Toxoplasma gondii type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 7, p. 1079-88, Jul 2016.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Apr 2012.

RODRIGUES, I. M. et al. Assessment of laboratory methods used in the diagnosis of congenital toxoplasmosis after maternal treatment with spiramycin in pregnancy. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 349, Jun 24 2014.

RORMAN, E. et al. Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of Toxoplasma gondii infection. **Reprod Toxicol**, v. 21, n. 4, p. 458-72, May 2006.

ROSOWSKI, E. E. et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein. **J Exp Med**, v. 208, n. 1, p. 195-212, Jan 17 2011.

SAEIJ, J. P. et al. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 324-7, Jan 18 2007.

SALMAN, S. et al. Pharmacokinetic properties of azithromycin in pregnancy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 1, p. 360-6, Jan 2010.

SARAF, P. et al. On the determination of Toxoplasma gondii virulence in mice. **Exp Parasitol**, v. 174, p. 25-30, Mar 2017.

SATO, B. L. et al. Validation of murine and human placental explant cultures for use in sex steroid and phase II conjugation toxicology studies. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 1, p. 103-12, Feb 2015.

SERRANTI, D.; BUONSENSO, D.; VALENTINI, P. [Congenital toxoplasmosis treatment]. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, n. 2, p. 193-8, Feb 2011.

SHER, A.; TOSH, K.; JANKOVIC, D. Innate recognition of Toxoplasma gondii in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. **Cell Mol Immunol**, v. 14, n. 1, p. 36-42, Jan 2017.

- SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-61, Apr 2014.
- SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 72-91, Mar 2011.
- SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 329-51, 2008.
- SIBLEY, L. D. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1530, p. 2749-61, Sep 27 2009.
- SILVA, L. A. et al. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e90237, 2014.
- SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol Res**, v. 107, n. 2, p. 253-60, Jul 2010.
- SOARES, R. M. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Vet Parasitol**, v. 178, n. 1-2, p. 29-34, May 31 2011.
- STEEL, H. C. et al. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 584262, 2012.
- SU, C. et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 15, p. 5844-9, Apr 10 2012.
- SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 7, p. 841-8, Jun 2006.
- SUZUKI, Y. et al. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516-8, Apr 22 1988.
- TALABANI, H. et al. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. **Parasite**, v. 17, n. 3, p. 177-82, Sep 2010.
- TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364-9, Mar 2009.
- UNNO, A. et al. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitol Int**, v. 57, n. 4, p. 515-8, Dec 2008.

VALLOCHI, A. L. et al. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am J Ophthalmol**, v. 139, n. 2, p. 350-1, Feb 2005.

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

WYROSDICK, H. M.; SCHAEFER, J. J. *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. **Anim Health Res Rev**, v. 16, n. 2, p. 150-62, Dec 2015.

XIAO, J. et al. Differential effects of three canonical *Toxoplasma* strains on gene expression in human neuroepithelial cells. **Infect Immun**, v. 79, n. 3, p. 1363-73, Mar 2011.

YAN, C. et al. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 137, Mar 10 2016.

9. ANEXOS

ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar da pesquisa chamada **Avaliação da susceptibilidade em vilos placentários humanos infectados pelas cepas clonais RH e ME-49 comparadas com cepas atípicas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 de *Toxoplasma gondii*** sob responsabilidade dos pesquisadores: Priscila Silva Franco; Angelica de Oliveira Gome; Bellisa de Freitas Barbosa; Paula Suellen Guimarães Gois; Thádia Evelyn de Araújo; Andressa da Silva Castro; Maria Célia dos Santos (médica obstetra); José Roberto Mineo e Eloisa Amália Vieira Ferro. Nesta pesquisa estamos buscando entender como ocorre a eliminação do parasito *Toxoplasma gondii* durante a gravidez.

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

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

A doação da sua placenta não oferece risco à sua saúde, uma vez que ela será normalmente expulsa pelo seu organismo após o parto. Com o estudo utilizando a sua placenta, será possível avaliar os mecanismos envolvidos na transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* por diferentes cepas deste parasito.

A senhora é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para senhora ou para seu filho. Uma cópia deste Termo livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa a senhora poderá entrar em contato com os pesquisadores:

-Priscila Silva Franco, Laboratório de Histologia – ICBIM, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama – Bloco 2B Telefone/Fax: 3218-2240

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

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

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, -- de ---- de ----.

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Assinatura da participante da pesquisa

Assinatura do pesquisado

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG

Continuação do Parecer: 1.155.475

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: A utilização da placenta não oferece risco à saúde, uma vez que ela será normalmente expulsa pelo organismo após o parto. O risco seria a identificação do sujeito de pesquisa, mas a equipe executora se comprometer com o sigilo absoluto da identidade do sujeito.

Benefícios: Com o estudo utilizando a placenta será possível avaliar os mecanismos envolvidos na transmissão vertical de *T. gondii* por diferentes cepas deste parasito.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam os termos obrigatórios de forma adequada.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os pesquisadores atenderam as pendências do parecer nº1.133.211 datado em 01 de julho de 2015.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: março/abril de 2016.

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

O CEP/UFU lembra que:

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br