



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ação de azitromicina, espiramicina e da associação de sulfadiazina e pirimetamina na infecção por cepas atípicas (Udi1-CH05 e Udi2-CH05) de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)

Mayara Ribeiro

Uberlândia
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ação de azitromicina, espiramicina e da associação de sulfadiazina e pirimetamina na infecção por cepas atípicas (Udi1-CH05 e Udi2-CH05) de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)

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

Mayara Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro
Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R484a

Ribeiro, Mayara, 1987-

2013

Ação de azitromicina, espiramicina e da associação de sulfadiazina e pirimetamina na infecção por cepas atípicas (Udi1-CH05 e Udi2-CH05) de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) / Mayara Ribeiro. -- 2013.

63 f.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Coorientador: José Roberto Mineo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Parasitologia - Teses. 2. Azitromicina - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. *Toxoplasma gondii* - Teses. 5. Toxoplasmose congênita - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.8

Dedicatória

Dedico mais esta conquista da minha vida à meus pais, Maria Aparecida Ribeiro e Nilo Nascimento Ribeiro, à meu irmão Fernando Divino Ribeiro e minhas primas Rafaela Silva Féres e Monique Silva Féres. Todos vocês me ajudaram na minha caminhada, com orações, conselhos ou somente com um sorriso, mas que foram essenciais para eu conseguir passar por todos os obstáculos e alcançar o sucesso no final.

Obrigada por tudo!

Amo vocês!

Agradecimentos

À Deus por me dar paciência, força e sabedoria para superar as dificuldades.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eloísa, por ter me dado oportunidade de trabalhar no seu laboratório e ter me ensinado várias coisas que serão importantes para minha vida. Obrigada por ter me proporcionado mais essa conquista na minha vida acadêmica.

*À meu co-orientador, Prof. Dr. José Roberto, por ter cedido as cepas de *T. gondii* e colaborado com este trabalho.*

À Priscila, que se tornou uma grande amiga e que me ajudou bastante nesse período da minha vida. Esse trabalho não seria possível sem a sua ajuda para manter os parasitos na cultura e sem suas considerações. Obrigada.

À Janice, minha amiga querida, que sempre esteve presente, tanto nas alegrias quanto nas tristezas. Obrigada por fazer parte da minha vida. Você com certeza me ajudou a ser uma pessoa melhor.

Às minhas queridas companheiras e amigas: Alessandra, Andressa, Angélica, Bellisa, Celene, Mariana, Letícia, Pâmela e Rafaela vocês são anjos que apareceram na minha. Obrigada pela ajuda, pelas ótimas conversas que tivemos, pelos conselhos e apoio durante esse tempo. Sei que sempre vou poder contar com vocês.

Às minhas amigas Christiane, Daniella, Flávia, Laís e Thaís que me acompanham desde a graduação. Mesmo não encontrando sempre, sei que vocês sempre torcem por mim e sempre que precisei vocês estavam lá para me ouvir. Amo vocês.

À toda minha família que sempre me apoiou e me compreendeu.

Ao pessoal da Histologia: Rosiane, Ester, Loyane, Mário, Rômulo, Layane, Fabrício, Eliete, Juscélia. Obrigada pela convivência e palavras amigas.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

Mensagem

*"É loucura odiar todas as rosas porque uma te espetou.
Entregar todos os teus sonhos porque um deles não se realizou.
Perder a fé em todas as orações porque em uma não foi
atendida. Desistir de todos os esforços porque um deles
fracassou.
É loucura descrer de todo amor porque um deles te foi infiel.
É loucura jogar fora todas as chances de ser feliz porque uma
tentativa não deu certo.
Espero que na tua caminhada não cometas estas loucuras.
Lembrando que sempre há uma outra chance, um outro
amor, uma nova força.
Para todo fim, um recomeço".*

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1.INTRODUÇÃO	10
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e a interação parasito hospedeiro	10
1.2.Estágios infectantes e ciclo de vida	11
1.3.Linhagens clonais de <i>T. gondii</i>	14
1.4.Resposta imune a <i>T. gondii</i>	15
1.5.Células trofoblásticas e resposta imune na gestação	17
1.6.Tratamento da toxoplasmose	19
2.JUSTIFICATIVA	22
3.OBJETIVOS.....	23
3.1.Objetivo geral	23
3.2.Objetivos específicos	23
4.MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Manutenção de células BeWo em cultura	24
4.2.Manutenção das cepas de <i>T. gondii</i>	24
4.3.Medicamentos	25
4.4.Ensaio de viabilidade celular	25
4.5.Infecção e tratamento de células BeWo	26
4.6.Tratamento dos parasitos	26
4.7.Dosagem de citocinas por ELISA	27
4.8.Análise estatística	27
5.RESULTADOS	28
5.1. Altas concentrações dos medicamentos foram tóxicas para as células	28
5.2.Azitromicina reduziu os índices de infecção e replicação intracelular de cepas atípicas nas células BeWo	28
5.3.Parasitos previamente tratados com azitromicina apresentaram menor índice de infecção e replicação intracelular em células BeWo	30
5.4.Produção de citocinas em células BeWo infectadas e tratadas	31

6.DISSCUSSÃO.....	33
7.CONCLUSÕES.....	39
FIGURAS.....	40
TABELAS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	62
ANEXO I	63
ANEXO II	64

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar vários tipos celulares. O parasito possui três linhagens clonais já estabelecidas, entretanto, há uma grande variedade de cepas atípicas principalmente em países da América do Sul e África. A infecção por *T. gondii* durante a gestação pode levar à passagem transplacentária do parasito, prejudicando o desenvolvimento do feto ou provocando o aborto. Os medicamentos utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita possuem limitações devido aos seus efeitos colaterais e resistência dos parasitos, por isso há necessidade de estudar novos medicamentos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a susceptibilidade das células BeWo frente à infecção pelas cepas Udi1-CH05 ou Udi2-CH05 de *T. gondii* e o efeito dos medicamentos azitromicina, espiramicina ou da associação sulfadiazina e pirimetamina nas células infectadas por essas cepas. Células BeWo foram tratadas com concentrações crescentes dos medicamentos para avaliar a viabilidade celular pelo ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol). Concentrações a partir de 400 µg/ml dos medicamentos diminuíram a viabilidade celular. Os parasitos da cepa Udi1-CH05 infectaram mais células do que os parasitos da cepa Udi2-CH05. Além disso, os índices de infecção e replicação intracelular de ambas as cepas foram reduzidos após o tratamento com azitromicina. A maior susceptibilidade das células BeWo à infecção pela cepa Udi1-CH05 pode estar relacionada com a diminuição da produção de TNF- α . Além disso, a redução do parasitismo dessa cepa pelos medicamentos, não está relacionada com as citocinas analisadas, mas com mecanismos da cepa de manter a infecção. Por outro lado, a redução do parasitismo da cepa Udi2-CH05 pelo tratamento com azitromicina pode estar relacionada com a diminuição da produção de IL-12. Assim, esse trabalho demonstrou que células BeWo são mais susceptíveis à infecção pela cepa Udi1-CH05 do que pela cepa Udi2-CH05 de *T. gondii* e que o tratamento com azitromicina foi mais eficiente em controlar a infecção e replicação do parasito do que os tratamentos convencionais utilizados.

Palavras-chave: cepas atípicas, células BeWo, azitromicina, citocinas.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects various cell types. There are three predominant lineages of *T. gondii*, however, distinct pattern is seen in South America and Africa, which is populated by different lineages showing more atypical genotypes. The transplacental passage of parasites could impaired fetal development and also could cause abortion. Conventional treatment of toxoplasmosis may cause side effects and resistance of parasites, because of that, development of studies with new drugs are necessary. In this context, the present study aimed to verify the susceptibility of BeWo cells after infection with Udi1-CH05 or Udi2-CH05 *T. gondii* strains and the effect of azithromycin, spiramycin and association of sulfadiazine and pyrimethamine in cells infected with these strains. BeWo cells were treated with different concentrations of drugs to evaluate cell viability by MTT assay. The concentration from 400 µg/ml of drugs reduced cell viability. Parasites of Udi1-CH05 strain infected more cells than Udi2-CH05. Furthermore, infection and intracellular replication indexes were reduced after azithromycin treatment. Higher susceptibility of BeWo cells after Udi-1-CH05 infection may be related to decrease TNF- α production. Moreover, reduced parasitism of this strain by drugs is not related to the cytokines analyzed, but with mechanisms to keep the strain infection. Reduction of parasitism of Udi2-CH05 by treatment with azithromycin may be related to the decreased production of IL-12. Thus, this study demonstrated that BeWo cells are more susceptible to infection by Udi1-CH05 than Udi2-CH05 and treatment with azithromycin was more effective in controlling infection and replication of parasite than conventional treatments used.

Keywords: atypical strains, BeWo cells, azithromycin, cytokines.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii* e a interação parasito hospedeiro

Toxoplasma gondii pertence ao filo Apicomplexa, no qual estão inseridos diversos patógenos de importância médico veterinária, como *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spP., *Eimeria* sp., *Babesia* sp., dentre outros. Todos os representantes deste filo são intracelulares obrigatórios (SKARIAH et al., 2010; MUNOZ et al., 2011; GUBBELS; DURASINGH, 2012). *T. gondii* possui forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de um arco (SOUZA et al., 2010). O parasito é o agente etiológico da toxoplasmose, doença que acomete aproximadamente um terço da população mundial (BLADER; SAEIJ, 2009; INNES, 2010; LAMBERT; BARRAGAN, 2010).

A região anterior do parasito é caracterizada pela presença do complexo apical onde está o conóide, uma organela em forma de cone oco, formada por três anéis de microtúbulos. Em seu interior estão as micronemas (MIC) e roptrias (ROP) (REY, 2008; GUBBELS; DURASINGH, 2012). Essas organelas, juntamente com os grânulos densos são importantes no processo de adesão e invasão celular pelo parasito e manutenção do mesmo no interior de células hospedeiras (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; PENG et al., 2011; DUPONT et al., 2012).

As micronemas, durante o contato do pólo apical do parasito com a superfície da célula, liberam proteínas que permitem a adesão do parasito à célula hospedeira (SOUZA et al., 2010; SOLDATI-FAVRE, 2008). Dentre elas, a proteína MIC-2 é expressa em todos os estágios invasivos do parasito e consegue ligar-se às moléculas de adesão do hospedeiro, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), permitindo ao parasito migrar até os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta (BARRAGAN; HITZIGER, 2008; MUNOZ et al., 2011; FURTADO et al., 2012).

As roptrias (ROPs) estão associadas à síntese do vacúolo parasitóforo e na invasão da célula hospedeira (SOUZA et al., 2010; GUBBELS; DURASINGH, 2012). Já os grânulos densos, estão presentes por toda a célula e descarregam seu conteúdo proteico dentro do vacúolo parasitóforo, permitindo a obtenção de nutrientes do hospedeiro e a manutenção do parasito no mesmo, já que as glicoproteínas desses

grânulos impedem a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo (NAM et al., 2009; SOUZA et al., 2010; GUBBELS; DURASINGH, 2012).

T. gondii, embora não possua uma estrutura envolvida na locomoção, como cílios e flagelos, consegue penetrar ativamente na célula hospedeira em um processo dependente de actina e miosina. Trata-se de um processo de motilidade denominado “gliding”, que ocorre por meio de movimentos espiralares do parasito e é dirigido pelo sistema actina-miosina que conecta a membrana interna dupla do parasito às proteínas adesivas transmembrânicas secretadas pelas micronemas (SIBLEY, 2004; SANTOS et al., 2009; SIBLEY, 2010; SOUZA et al., 2010).

1.2. Estágios infectantes e ciclo de vida

T. gondii possui três estágios infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas e é capaz de infectar vários tipos celulares de diferentes hospedeiros, incluindo o homem (RAVINDRAN; BOOTHROYD, 2008; LAMBERT; BARRAGAN, 2010).

Os taquizoítas são encontrados na fase aguda da infecção em que ocorre a rápida multiplicação do parasito (PENG et al., 2011). Nesse estágio, o parasito é capaz de infectar vários tecidos, como cérebro, retina e placenta (MASOCHA; KRISTENSSON, 2012; FURTADO et al., 2012; CARLIER et al., 2012) e pode levar a manifestações clínicas da toxoplasmose devido à resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; FERGUSON et al., 2013). Os taquizoítas se multiplicam dentro do vacúolo parasitóforo, formado durante o processo de invasão (RAVINDRAN; BOOTHROYD, 2008). Com o intenso parasitismo pode ocorrer ruptura da célula, liberando taquizoítas que podem infectar novas células ou serem fagocitados por células do hospedeiro (BLADER; SAEIJ, 2009).

Com o início da resposta imune do hospedeiro, o parasito consegue estabelecer uma infecção crônica por meio da conversão de taquizoítas em bradizoítas, que representam a fase lenta de multiplicação do protozoário (LÜDER et al., 2009; PENG et al., 2011). Os bradizoítas sobrevivem dentro de cistos teciduais, sendo a forma de resistência do parasito, permitindo assim que a disseminação e patogenia sejam diminuídas, mas a transmissão aumentada (KATO et al., 2012; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). Dependendo das condições imunológicas do hospedeiro, a infecção pode passar por um processo de reagudização e os bradizoítas voltam à

forma taquizoíta de multiplicação e disseminação rápida. É o que ocorre em casos de pacientes imunocomprometidos que são acometidos pela infecção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Os esporozoítas são encontrados no interior de oocistos que são liberados nas fezes dos felinos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Oocistos são muito infectantes, resistentes e facilmente veiculados, portanto representam a forma de resistência encontrada no meio ambiente (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). A liberação desses oocistos ocorre em um período de 7 – 21 dias após a infecção do hospedeiro definitivo e, sob condições favoráveis do meio ambiente passam por um processo de esporulação, formando em seu interior esporozoítas (MONTROYA; LIESENFELD; 2004).

T. gondii possui ciclo de vida heteroxênico (Figura 1). Espécies da família Felidae são os hospedeiros definitivos nos quais ocorre a fase sexuada do ciclo. A fase assexuada realiza-se nos hospedeiros intermediários, como mamíferos e aves (JEFFERS; SULLIVAN, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013). Dentre as formas de contágio do parasito estão a ingestão de alimento ou água contaminada com oocistos, liberados na natureza através de fezes de felinos; ingestão de carne mal cozida contendo cistos; transfusões de sangue ou órgãos contaminados, acidentes laboratoriais e a transmissão vertical (DUBEY et al., 2012; JONES; DUBEY, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013).

Os gatos se infectam por meio da ingestão de taquizoítas, oocistos presentes no meio ambiente ou ainda cistos contendo bradizoítas. As formas infectantes irão penetrar em células epiteliais do intestino delgado, onde o parasito multiplica por esquizogonia, processo no qual ocorre divisão nuclear sem divisão citoplasmática, formando os esquizontes. Posteriormente, os núcleos formados migram para a região cortical do esquizonte que vão ser lentamente individualizados pela membrana plasmática, originando os merozoítas que iniciam a formação dos gametas. Os microgametas (gametas masculinos) saem da célula onde estão e se locomovem até a célula onde se encontram os macrogametas (gametas femininos) fecundando-os. Forma-se o ovo ou zigoto, que evolui dentro do epitélio intestinal e passa a ser envolto por uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto que são liberados no ambiente, onde tornam-se esporulados (DUBEY et al., 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos contendo esporozoítas. Os esporozoítas ao serem liberados penetram no intestino e invadem vários tipos celulares, onde irão multiplicar-se intensamente formando os taquizoítas. Devido a sua habilidade de sobreviver dentro de monócitos, macrófagos e células dendríticas, o parasito tem capacidade de disseminar por vários órgãos. A pressão imune sobre o parasito resulta na formação de cistos contendo bradizoítas, a forma de resistência do parasito (MAUBON et al., 2008).

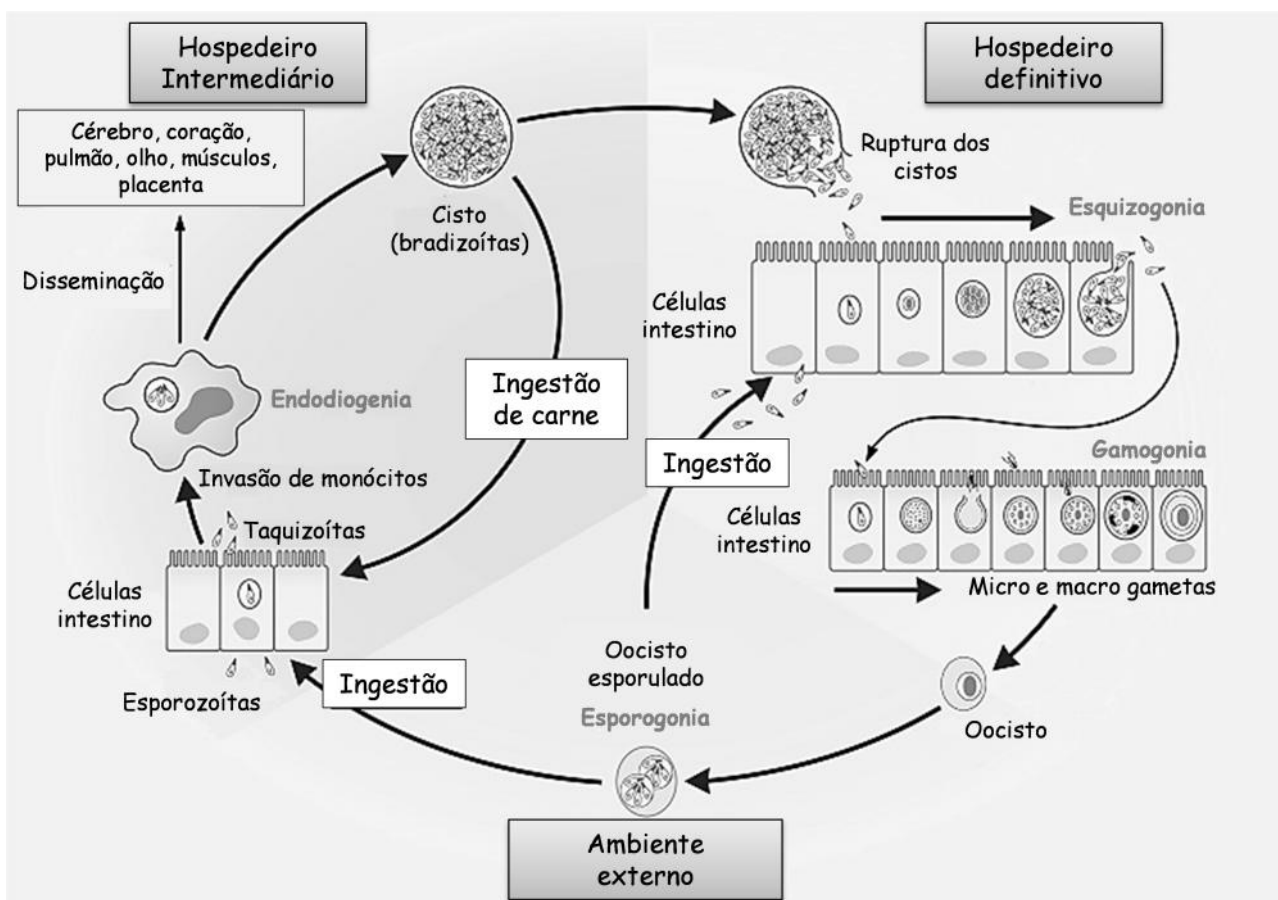


Figura 1: Ciclo de vida de *T. gondii*. Os hospedeiros definitivos adquirem o parasito pela ingestão de cistos ou oocistos. As formas infectantes se multiplicam nas células do intestino, formando esquizonte que são individualizados dando origem aos gametas. Após a fecundação, ocorre a formação de oocistos que tornam-se esporulados no meio ambiente em condições ideais de umidade e temperatura. Os hospedeiros intermediários ingerem oocistos contendo esporozoítas. Os esporozoítas ao serem liberados penetram no intestino e invadem vários tipos celulares, onde irão multiplicar-se intensamente formando os taquizoítas que disseminam por vários tecidos do hospedeiro (retirado e adaptado de ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.3. Linhagens clonais de *T. gondii*

As cepas de *T. gondii* isoladas principalmente na Europa e América do Norte são classificadas em três linhagens clonais (tipos I, II e III). As três linhagens são muito semelhantes geneticamente, mas diferem quanto à virulência. Cepas do tipo I, como RH, são mais virulentas e letais em camundongos do que as do tipo II (ME49) e III (VEG). Essas são consideradas de virulência moderada e podem estabelecer uma infecção crônica, pois as formas taquizoítas se multiplicam lentamente, se comparadas com as cepas do tipo I, e a formação de cistos teciduais é mais rápida (SAEIJ et al., 2005).

Estudos demonstram que existem diferenças nas manifestações clínicas da infecção por *T. gondii* e, provavelmente estejam associadas ao tipo de cepa (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; HILL; SU, 2012). Em humanos, os três tipos de cepas clonais são capazes de causar toxoplasmose, no entanto, as cepas do tipo I geralmente estão associadas a manifestações clínicas graves da doença, como toxoplasmose ocular. Já as cepas tipo II são mais comumente isoladas de infecções crônicas e congênitas e em pacientes imunocomprometidos, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; SIBLEY et al, 2009). As cepas do tipo III são mais comuns em animais e não estão associadas à manifestação de sintomas. Os poucos casos encontrados em humanos estão relacionados com imunodeficiência do hospedeiro (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Além dessas três linhagens clonais, vários estudos mostram que há uma grande diversidade de cepas que não pertencem a nenhuma dessas linhagens clonais (SIBLEY et al, 2009; KHAN et al., 2011; SU et al., 2012). Essas cepas atípicas são denominadas recombinantes ou exóticas e são encontradas principalmente na África e América do Sul (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; PETERSEN, 2007; RAJENDRAN; DUBEY, 2012).

Cepas atípicas estão relacionadas tanto com toxoplasmose ocular quanto congênita (AJZENBERG et al., 2009; BOTTÓS et al., 2009; BOUGHATTAS et al., 2011). No Brasil, cepas atípicas apresentam genótipos que diferem de outras cepas já identificadas no mundo (PENA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2013). A rede filogenética de *T. gondii* nesse país é altamente reticulada, evidenciando que há altos índices de recombinação (FERREIRA et al., 2006; PENA et al., 2008). Essas cepas são

caracterizadas genotipicamente através de PCR-RFLP (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição) revelando alta diversidade de cepas exóticas no país (PENA et al., 2013; SOARES et al., 2011). Acredita-se que o isolamento geográfico e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética de cepas brasileiras de *T. gondii* (SIBLEY; AJIOKA 2008; SIBLEY et al., 2009).

No Brasil, cepas atípicas já foram isoladas em vários estados, como Rio Grande do Norte, Espírito Santo e Minas Gerais (PENA et al., 2013; CARNEIRO et al., 2013; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013). Essas cepas foram encontradas tanto em pacientes que apresentavam toxoplasmose ocular, em pacientes HIV positivos com toxoplasmose cerebral e também que tinham toxoplasmose congênita (FERREIRA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2013). Além disso, muitas cepas de *T. gondii* são isoladas em uma grande diversidade de animais como gatos, suínos, aves e cães (PENA et al., 2008; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; SOARES et al., 2011; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013). Na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, um grupo de pesquisadores isolou duas cepas de *T. gondii* a partir do coração de galinhas. Essas cepas foram denominadas Udi1-CH05 e Udi2-CH05. Em camundongos, foi observado que Udi1-CH05 apresentou menor mortalidade nos camundongos. Já a cepa Udi2-CH05 provocou maior mortalidade entre os camundongos estudados (SALOMÃO, 2007).

1.4. Resposta imune a *T. gondii*

A invasão de *T. gondii* nas células do hospedeiro desencadeia respostas do sistema imune inato e adaptativo (MAUBON et al., 2008). Receptores do tipo *toll like receptors* (TLRs) são importantes durante a resposta imune inata, porque é capaz de reconhecer ligantes expressos pelo parasito (YAROVINSKY; SHER, 2006; DENKERS, 2010). A interação de *T. gondii* com esses receptores, induz a produção de interleucina-12 (IL-12) pelas células da imunidade inata do hospedeiro, como células *natural killer* (NK), células dendríticas e macrófagos (MILLER et al., 2009; PIFER; YAROVINSKY, 2011; SANECKA; FRICKEL, 2012). Dentre as funções de IL-12 está a indução da produção de interferon gamma (IFN- γ) (GEE et al., 2009; METZGER, 2010).

Outra citocina que exerce papel importante na proteção inicial contra a infecção é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Vários tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, células T e células dendríticas produzem esta citocina, que

aumenta a capacidade microbicida de macrófagos e induz as células NK a produzirem IFN- γ (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; KÖNER et al., 2010).

Após a resposta inicial da imunidade inata, os linfócitos tornam-se ativados e passam a produzir outras citocinas. A imunidade adquirida é representada pela atividade de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, portanto, a imunidade mediada por células é predominante durante a infecção por *T. gondii*, quando macrófagos, linfócitos T, células NK e leucócitos polimorfonucleares são funcionalmente ativos em hospedeiros imunocompetentes (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; SILVA; LANGONI, 2009). IL-12 leva a diferenciação de células T CD4 *naïves* em células TCD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1), que irão produzir citocinas inflamatórias como IFN- γ (ANNUNZIATO; ROMAGNAN, 2009; O'SHEA; PAUL, 2010). IL-12 também estimula a produção IFN- γ por linfócitos TCD8⁺. Além disso, essas células produzem enzimas proteolíticas capazes de romper a membrana de parasitos livres ou provocar a lise de células infectadas, exercendo, assim, importante papel na proteção do hospedeiro contra o parasito (MALEK; CASTRO, 2010; GIGLEY et al., 2011).

IFN- γ é o maior mediador de resistência a *T. gondii* e promove vários mecanismos intracelulares para inibir a replicação e eliminar o parasito (DUPONT et al., 2012; SUZUKI et al., 2011). Essa citocina favorece a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, previne a ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reagudização da infecção no hospedeiro (MILLER et al., 2009). Assim, essa citocina se mostra eficaz tanto no controle da fase aguda quanto da fase crônica da toxoplasmose (ALIBERTI, 2005). Além disso, IFN- γ ativa macrófagos que são células fagocíticas importantes tanto na imunidade inata quanto adaptativa, pois além de secretarem citocinas pró-inflamatórias, fagocitam e destroem patógenos (SILVA; LANGONI, 2009).

A produção de IFN- γ e TNF- α a partir de células Th1 e TCD8⁺ intensifica a função dos macrófagos e promove o controle do patógeno (GIGLEY et al., 2011; MUNOZ et al., 2011). Assim, a infecção por *T. gondii* promove uma resposta imunológica do tipo Th1, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que protegem o hospedeiro contra o parasito. Entretanto, *T. gondii* é capaz de induzir várias mudanças na transcrição de genes do hospedeiro, incluindo os que estão envolvidos no metabolismo energético, resposta imune e sinalização, conseguindo,

dessa forma, evadir da resposta imune desencadeada pelo hospedeiro e estabelecer seu nicho como parasito intracelular (HUNTER; SIBLEY, 2012).

1.5. Células trofoblásticas e resposta imune na gestação

O trofoblasto é uma barreira celular de origem fetal que se interpõem entre a circulação materna e fetal, constituindo uma ferramenta essencial no sucesso da gestação. Essas células são responsáveis por romper a barreira epitelial uterina, promovendo a implantação do blastocisto no endométrio. O trofoblasto ainda permite nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (KOGA et al., 2009; JOHN; HEMBERGER, 2012; POLLHEIMER; KNÖFLER, 2012).

Células trofoblásticas expressam receptores que são capazes de reconhecer a presença de bactérias, vírus, parasitos, células em apoptose e tecidos danificados. Após este reconhecimento, o trofoblasto secreta tipos específicos de citocinas, como o fator de crescimento tumoral $\beta 1$ (TGF- β), TNF- α , IL-12 e IL-10, que vão agir sobre as células presentes na decídua, influenciando na resposta frente ao patógeno (KOGA et al., 2009; ENTRICAN, 2002; KLAFFENBACH et al., 2005). Além disso, células trofoblásticas humanas secretam mediadores inflamatórios, como MIF e IL-6, que tem o potencial de modular a atividade de monócitos, tornando-os capazes de controlar processos infecciosos, como a toxoplasmose. Isto prova que o trofoblasto é uma célula que coordena a atividade imunológica na interface materno-fetal (CASTRO et al 2013)

Um balanço entre citocinas de perfil Th1 e Th2 é necessário para o sucesso da gestação (MAUBON et al., 2008; CHALLIS et al., 2009; SYKES et al., 2012). O processo de implantação e invasão do trofoblasto requer um microambiente inflamatório. A implantação do blastocisto ao endométrio está associada a um aumento na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (DEKEL et al, 2010; GRÜMMER; WINTERHAGER, 2011; MOR et al., 2011). Além disso, citocinas de perfil Th1 mantêm a decídua e contribuem na modificação das artérias espiraladas, permitindo maior fluxo sanguíneo para o embrião (ASHKAR et al., 2000; HARRIS, 2010).

Apesar desse perfil pró-inflamatório ser necessário para a implantação, durante a gestação ocorre uma polarização para a resposta imunológica do tipo Th2, a

qual é responsável pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β 1, que favorecem o desenvolvimento do feto semi-alógeno. Citocinas anti-inflamatórias são liberadas por células maternas como células NK uterinas, linfócitos, macrófagos, e por células fetais, como o trofoblasto (CHALLIS et al., 2009; NAGAMATSU; SCHUST, 2010; SALAMONE et al., 2012). Hormônios relacionados à gestação como progesterona e estradiol também são responsáveis pela indução de citocinas anti-inflamatórias (SYKES et al., 2012).

A expressão aumentada de citocinas do perfil Th2 tem o potencial de causar maior susceptibilidade à toxoplasmose, consequentemente, à infecção placentária e fetal (ABOU-BACAR et al., 2004). Desse modo, um perfil de resposta Th1, como o desencadeado pela infecção por *T. gondii*, pode causar desequilíbrio no microambiente placentário podendo levar a complicações na gestação (SILVA; LANGONI, 2009).

A transmissão transplacentária de *T. gondii* pode ocorrer em qualquer período gestacional, mas a gravidade dos danos fetais depende significativamente da idade gestacional em que ocorreu a transmissão. Caso a gestante se infecte primariamente por *T. gondii* no primeiro trimestre da gravidez, o processo inflamatório desencadeado pela presença do parasito aumenta a probabilidade de aborto, além de possíveis alterações neurológicas fetais importantes. Entretanto, se a primeira infecção ocorrer no terceiro trimestre de gestação a taxa de aborto é significativamente menor, contudo, a possibilidade da transmissão do patógeno para o feto é maior, mas com menores danos fetais (BOJAR; SZYMAŃSKA, 2010). Além da barreira física, a barreira imunológica também é importante na transmissão do parasito.

Estudos que tentam esclarecer os processos imunológicos e bioquímicos desencadeados por células trofoblásticas para favorecer a gestação, mesmo na presença de patógenos, são frequentes. Dentre as células utilizadas para esses estudos estão as células BeWo. Essas células foram isoladas de um coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey. Células BeWo apresentam propriedades de células trofoblásticas humanas não tumorais. Secretam os hormônios gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio lactogênico placentário (RAMOS et al., 2008), além de citocinas como IL-6, IL-8 e IL-10 (BENNET et al., 1997; FUJISAWA et al., 2000). Existem alguns estudos sobre toxoplasmose congênita utilizando células BeWo como modelo

experimental (BARBOSA et al., 2008; FRANCO et al. 2011; GOMES et al, 2012; CASTRO et al., 2013).

1.6. Tratamento da toxoplasmose

O tratamento da toxoplasmose é indicado aos indivíduos imunocomprometidos e gestantes, não sendo indicado aos indivíduos imunocompetentes e assintomáticos (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004). O tratamento mais utilizado contra a toxoplasmose é a associação de sulfadiazina e pirimetamina combinados com ácido folínico. Nas gestantes, esse tratamento é realizado quando há confirmação de infecção fetal. Durante o primeiro trimestre da gestação, caso não haja infecção fetal, é indicado o tratamento com espiramicina (KAYE, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A sulfadiazina e pirimetamina agem sinergicamente no bloqueio da via de síntese do folato por meio da inibição das enzimas dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), que são essenciais para a sobrevivência e replicação do parasito (ANDERSON, 2005). O uso de pirimetamina não é recomendado durante o primeiro trimestre de gestação por ter efeito teratogênico (MONTROYA; REMINGTON, 2008; KAYE, 2011). Além disso, pirimetamina pode diminuir a atividade da medula óssea. Por esses motivos recomenda-se a associação com ácido folínico que irá repor o folato que foi inibido pelos medicamentos (MONTROYA; REMINGTON, 2008). Assim, se a gestante se infectar depois de 18 semanas ou se for confirmada a infecção do feto, utiliza-se a combinação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; MONTROYA; REMINGTON, 2008). Dessa maneira, torna-se necessário o teste e o desenvolvimento de novas drogas que visem minimizar os possíveis efeitos colaterais indesejáveis quando a infecção fetal é confirmada.

Análise de 16 genótipos diferentes de *T. gondii*, pertencentes aos três tipos clonais, submetidos ao tratamento com pirimetamina para verificar a relação entre genótipo e susceptibilidade da droga, demonstrou que cepas dos tipos II e III são mais susceptíveis ao tratamento que a cepa RH (tipo I) (MENECEUR et al., 2008). Além disso, algumas cepas apresentam resistência ao tratamento com sulfadiazina (MENECEUR et al., 2008).

Como mencionado, no primeiro trimestre da gestação, o tratamento durante a fase aguda da doença é realizado com espiramicina que é capaz de alcançar altas concentrações nos tecidos, prevenindo a transmissão vertical de *T. gondii* (ELSHEIKHA, 2008; KAYE, 2011). A espiramicina apresenta 16 átomos de carbono no anel de lactona (KWIATKOWSKA; MASLINSKA, 2012). Essa droga não oferece risco ao feto porque não consegue atravessar a barreira placentária. No entanto, essa é uma limitação desse medicamento, uma vez que não é capaz de combater a infecção se houver passagem para o feto (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

Espiramicina pertence ao grupo dos macrolídeos, que constituem uma classe de antibióticos de amplo espectro caracterizados por um anel de lactona macrocíclico que se liga a diferentes açúcares e geralmente são utilizados para tratar infecções de pele e do trato respiratório causado por bactérias Gram-positivas, mas também tem efeito contra algumas bactérias Gram-negativas (STEEL et al., 2012; KWIATKOWSKA; MASLINSKA, 2012). Além de serem eficazes contra infecções bacterianas, os macrolídeos são efetivos no combate à infecções por parasitos intracelulares, como *T. gondii* e *Leishmania* spp. (SINAGRA et al., 2007; COSTA et al., 2009; PETROPOULOS et al., 2009; SRIVASTAVA et al., 2011).

O modo de ação dos macrolídeos é a inibição da síntese proteica por se ligarem à subunidade 50S do ribossomo do patógeno (STEEL et al., 2012). Dessa forma, os macrolídeos possuem atividade anti-inflamatória, porque inibe a síntese de toxinas microbianas e outros fatores de virulência que induzem respostas pró-inflamatórias no hospedeiro. Além disso, macrolídeos são capazes de inibir a atividade pró-inflamatória de células da imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (STEEL et al., 2012).

Dentre os medicamentos que estão sendo estudados para o controle da toxoplasmose está a azitromicina, que também pertence ao grupo dos macrolídeos e diferencia-se da espiramicina por apresentar 15 átomos de carbono no anel de lactona (KWIATKOWSKA; MASLINSKA, 2012). Azitromicina é uma nova geração de macrolídeos que apresenta uma melhor farmacocinética, melhor concentração tecidual, poucos efeitos colaterais e pode ser administrada em dose única diária (RAMSEY et al., 2003; SALMAN et al., 2010).

Azitromicina já foi utilizada tanto em modelos murinos quanto em estudos *in vitro* e apresentou excelentes resultados em diminuir a infecção por *T. gondii* (COSTA

et al., 2009; FRANCO et al, 2011). Estudos utilizando *Calomys callosus* como modelo experimental demonstram que o tratamento com azitromicina em fêmeas gestantes e infectadas por *T. gondii* impediu a transmissão vertical do parasito e reduziu infecção da região ocular do feto pelo parasito (COSTA et al., 2009; LOPES et al 2009). Além disso, esse medicamento também foi capaz de reduzir a infecção em células BeWo quando infectadas pela cepa RH de *T. gondii* (FRANCO et al., 2011). Apesar desse medicamento apresentar bons resultados em roedores e em células humanas infectadas com cepa virulenta de *T. gondii*, o seu papel durante a infecção por cepas atípicas ainda não é conhecido. Assim, faz-se necessário conhecer o efeito de azitromicina no controle da infecção por *T. gondii* pertencente a cepas atípicas, visto que são predominantes no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, há uma grande diversidade de cepas recombinantes ou exóticas de *T. gondii* (PENA et al., 2013; CARNEIRO et al., 2013; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013). A maioria dos estudos sobre o parasito utiliza cepas clonais provenientes da América do Norte e Europa (cepas tipo I, II ou III), o que não representam a realidade encontrada em nosso país. Dentre as formas de transmissão do parasito, a transmissão vertical é uma das mais graves, uma vez que pode levar ao aborto e a má formação fetal (BOJAR; SZYMAŃSKA, 2010). Portanto, entender a susceptibilidade de células trofoblásticas humanas a cepas atípicas, encontradas no Brasil e estabelecer a eficiência de fármacos sobre essas cepas podem adicionar importantes dados para compreensão e tratamento da toxoplasmose congênita em nosso país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar comparativamente a susceptibilidade das células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) frente à infecção pelas cepas Udi1-CH05 ou Udi2-CH05 de *T. gondii* e o efeito das drogas azitromicina, espiramicina ou da associação sulfadiazina e pirimetamina nas células trofoblásticas infectadas por essas cepas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do tratamento com azitromicina, espiramicina ou da associação entre sulfadiazina e pirimetamina em células BeWo;
- Determinar os índices de infecção e replicação intracelular de cepas atípicas de *T. gondii* (Udi1-CH05 ou Udi2-CH05) em células BeWo tratadas ou não com azitromicina, espiramicina ou associação entre sulfadiazina e pirimetamina;
- Determinar os índices de infecção e replicação intracelular de cepas atípicas de *T. gondii* (Udi1-CH05 ou Udi2-CH05) em parasitos foram previamente tratados com azitromicina, espiramicina ou associação entre sulfadiazina e pirimetamina;
- Avaliar a produção de citocinas nas células infectadas ou não pelas cepas Udi1-CH05 ou Udi2-CH05 e/ou tratadas ou não com azitromicina, espiramicina ou associação entre sulfadiazina e pirimetamina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção de células BeWo em cultura

Células da linhagem de coriocarcinoma humano (BeWo) provenientes do *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA) foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Paisley, Inglaterra) 1640 (Sigma Chemical CO. St. Louis, USA), suplementado com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e soro bovino fetal (SBF) (10%) (meio completo) em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C de acordo com Barbosa e colaboradores 2008.

O repique das células foi realizado a cada dois dias. As garrafas contendo células foram removidas com auxílio de tripsina e receberam novo meio de cultura e foram transferidas para tubos de 15 ml. Em seguida foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura e depois distribuído em novas garrafas de cultura.

As células utilizadas foram compradas comercialmente, assim, não foi necessária aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo I).

4.2. Manutenção das cepas de *T. gondii*

As cepas Udi-1-CH05 e Udi-2-CH05 de *T. gondii* foram mantidas na cavidade abdominal do roedor *Callomys callosus* no Biotério do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia. A aprovação do comitê de ética em experimentação animal está no Anexo II. O exudato peritoneal dos roedores foi coletado e centrifugado a 400 x g, em temperatura ambiente, por 5 minutos. Os taquizoítas resultantes foram ressuspensionados e lavados 2x em meio RPMI 1640. Os parasitos foram colocados em garrafas de cultura contendo células BeWo e meio RPMI suplementado com antibióticos e soro bovino fetal (2%) em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C e foram mantidos por meio de repiques.

4.3. Medicamentos

Azitromicina (Biofarma, Uberlândia, Brasil), espiramicina e sulfadizina, pirimetamina em pó (Sigma Chemical Co) foram reconstituídas em DMSO a uma concentração de 3 mg/ml. A partir dessa solução, foi preparada uma solução estoque de 1 mg/ml em meio completo de cultura. Essa solução estoque foi diluída em meio de cultura para obtenção das concentrações dos medicamentos que foram utilizadas no trabalho.

4.4. Ensaio de viabilidade celular

Células BeWo, em uma concentração de 5×10^4 /poço, foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em um volume de 200 μ l/poço e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com as concentrações: 50, 100, 200 ou 400 μ g/mL de azitromicina ou espiramicina, de acordo com Franco e colaboradores, 2011. Para a associação de sulfadiazina com pirimetamina, as células foram tratadas seguindo a proporção de 25% de sulfadiazina e 1% de pirimetamina (DEROUIN; CHASTANG, 1989; MENECEUR et al., 2008; JIN et al., 2009).

A viabilidade de células BeWo após 24 horas de incubação com concentrações crescentes de DMSO e ao tratamento com azitromicina, espiramicina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina diluídas em DMSO foi avaliada utilizando-se o ensaio calorimétrico de tetrazólio de metiltiazol (MTT, Sigma Chemical Co.). A quantidade de 5×10^4 células BeWo

Após o tratamento, os sobrenadantes foram removidos e 10 μ l/poço de tetrazólio de metiltiazol (MTT, Sigma Chemical Co.) mais 90 μ l/poço de meio completo foi adicionado. As placas foram incubadas em estufa e, após 3 horas, os sobrenadantes foram removidos e as partículas insolúveis de coloração roxa (cristais de formazan) produzida por células viáveis que metabolizaram o MTT, foram então solubilizadas pela adição de 100 μ l/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) (MOSMANN, 1983). 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. Este ensaio foi realizado com o objetivo de estabelecer doses não citotóxicas para o tratamento das células infectadas.

4.5. Infecção e tratamento de células BeWo

Utilizando tripsina, as células de linhagem BeWo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas a 400 x *g* por 5 minutos e contadas na câmara de *Newbauer* para ajustar a concentração de 5×10^4 células/poço em um volume de 200 µl/poço de meio RPMI. As células foram mantidas em placa de 24 poços sob lamínulas redondas de 13 mm em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de três parasitos por célula (3:1) por 24 horas e depois tratadas com azitromicina (100 µg/mL), espiromicina (100 µg/mL) e associação de sulfadiazina (100 µg/mL) e pirimetamina (4 µg/mL). Como controles, os mesmos procedimentos foram realizados, porém na ausência de infecção e tratamento (controle não infectado não tratado); na ausência de infecção (controle não infectado tratado) ou na ausência do tratamento (controle infectado não tratado). Depois de 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à – 70 °C para dosagem de citocinas. As células foram fixadas em formol 10% em *phosphate buffered saline* (PBS) e coradas com azul de toluidina 1% por 10 segundos e montadas em lâminas. 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 médio de parasitos intracelulares a cada 200 células infectadas examinadas (proliferação intracelular do parasito).

4.6. Tratamento dos parasitos

Os taquizoítas livres das cepas Udi-1-CH05 e Udi-2-CH05 foram contados na câmara de *Newbauer* para obtenção de $1,5 \times 10^5$ parasitos/poço e foram tratados com azitromicina (100 µg/mL), espiromicina (100 µg/mL) e associação de sulfadiazina (100 µg/mL) e pirimetamina (4 µg/mL) por 3 horas a 37 °C e 5% CO₂. Depois, células BeWo (mantidas em placa de 24 poços sob lamínulas redondas, como descrito anteriormente) foram infectadas com os parasitos tratados por 24 horas. As células foram fixadas em formol 10% em PBS e coradas com azul de toluidina 1% por 10

segundos e montadas em lâminas. As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e a porcentagem de células infectadas e proliferação intracelular do parasito foram quantificados como descrito anteriormente.

4.7. Dosagem de citocinas por ELISA

Os sobrenadantes coletados foram utilizados para determinar a concentração de IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β pelo ensaio imunoenzimático ELISA. Primeiramente as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IL-12, anti-TNF- α (BD Biosciences, New Jersey, USA), anti-IL-10 ou anti-TGF- β (R&D Systems, Minneapolis, USA), *overnight* a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBS + 10% SBF para IL-12 e TNF- α ; PBS + 1% soro albumina bovina (BSA) para IL-10 e PBS + 5% Tween + 0,05% azida para TGF- β por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e as amostras adicionadas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Depois de lavadas, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção anti-IL-12 ou anti-TNF- α conjugado com estreptavidina acoplada a peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente ou com anticorpo anti-IL-10 ou anti-TGF- β por 2 horas em temperatura ambiente. Para IL-10 e TGF- β foi adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por 20 minutos em temperatura ambiente. Depois de lavadas, adicionou-se 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) (Polyscience, Inc, Warrington, PA) para detecção dos imunocomplexos. Estes foram quantificados em um leitor de microplacas (Titertek®multiskan plus). As concentrações das citocinas foram determinadas com base em uma curva padrão obtida de concentrações conhecidas de cada citocina. Os limites de detecção foram de: 7.81 pg/ml para IL-12 e TNF- α , 62.5 pg/mL para IL-10 e 31.3 pg/ml para TGF- β .

4.8. Análise estatística

Todos os dados foram expressos com média $\pm$ SEM (erro padrão da média). As diferenças estatísticas foram analisadas pelos testes One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni ou Dunnet; ou pelo teste *t* de *student*, quando apropriado. As análises foram feitas pelo programa Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Altas concentrações dos medicamentos foram tóxicas para as células

A porcentagem de células viáveis após o tratamento com os medicamentos diluídos em DMSO foi avaliada pelo ensaio de MTT (Figura 1). Observou-se que a concentração ideal de DMSO não pode exceder 3%, já que quando utilizado a concentração de 5% a viabilidade foi diminuída significativamente (Figura 1A). Assim, os medicamentos foram diluídos de forma que quando obtida a concentração final desejada, a concentração de DMSO não ultrapassasse 1%.

Quando as células foram tratadas com azitromicina a concentração de 400 µg/ml foi tóxica para as células BeWo (Figura 1B). O mesmo ocorreu no tratamento com espiramicina (Figura 1C). O tratamento com a associação de sulfadiazina e pirimetamina foi tóxico a partir da concentração de 400/16 µg/ml (Figura 1D).

Segundo esses resultados, para a realização dos experimentos foi escolhida a concentração de 100 µg/mL para azitromicina ou espiramicina e para a associação foi utilizado 100 µg/ml de sulfadiazina e 4 µg/ml de pirimetamina.

5.2. Azitromicina reduziu os índices de infecção e replicação intracelular de cepas atípicas nas células BeWo

Os índices de infecção (porcentagem de células infectadas) e replicação intracelular do parasito (número total de parasitos/200 células) em células BeWo foram determinados após tratamento ou não com azitromicina, espiramicina e associação (Figura 2).

Os índices de infecção e replicação intracelular da cepa Udi1-CH05 em células do controle infectado não tratado foram maiores quando comparado com a cepa Udi2-CH05 (Figura 2A e 2B). O tratamento com azitromicina foi capaz de reduzir o índice de infecção e replicação intracelular nas células infectadas por ambas as cepas e esses índices foram menores em células infectadas por Udi2-CH05 comparadas com células infectadas por Udi1-CH05. Por outro lado, espiramicina reduziu significativamente o índice de infecção e replicação intracelular somente nas células infectadas com Udi1-CH05. Quando as cepas foram comparadas, não observamos diferença significativa

(Figura 2A e 2B). A associação de sulfadiazina e pirimetamina não reduziu o índice de infecção quando comparado com as células infectadas e não tratadas, mas reduziu o índice de replicação intracelular nas células infectadas por Udi2-CH05. Quando as cepas foram comparadas, observamos diferença significativa entre elas, tanto para o índice de infecção, quanto para o índice de replicação intracelular, maior redução desses índices em células infectadas por Udi2-CH05 (Figura 2A e 2B).

O efeito dos medicamentos no índice de infecção e replicação também foi analisado pela taxa de inibição desses dois índices e está representado na tabela 1. Cada tratamento foi comparado com o controle infectado não tratado e o tratamento com azitromicina foi comparado com os demais tratamentos. Durante a infecção por Udi1-CH05, azitromicina, espiramicina e associação de sulfadiazina e pirimetamina apresentaram significativa inibição do índice de inibição da infecção de 15,62%, 21,44% e 13,2%, respectivamente. Por outro lado, esse índice não foi significativamente diferente quando o tratamento com azitromicina foi comparado com os demais medicamentos. Já a infecção por Udi2-CH05, apenas o tratamento com azitromicina reduziu o índice de infecção (18,39%) e essa redução foi significativa quando comparado com a espiramicina.

A inibição da replicação intracelular foi significativa em relação ao controle infectado não tratado nas células infectadas por Udi1-CH05 e tratadas com azitromicina (27,34%) e espiramicina (33,34%). Azitromicina e associação de sulfadiazina e pirimetamina inibiram em 23,89% e 27,61%, respectivamente, o índice de replicação intracelular da cepa Udi2-CH05. Não observamos diferença entre os tratamentos no índice de inibição da replicação tanto de Udi1-CH05 quanto de Udi2-CH05 (Tabela 1).

Fotomicrografias representativas de células BeWo infectadas pelas cepas Udi1-CH05 e Udi2-CH05 e tratadas com azitromicina, espiramicina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina estão demonstradas nas figura 3.

5.3. Parasitos previamente tratados com azitromicina apresentaram menor índice de infecção e replicação intracelular em células BeWo

Os índices de infecção e replicação intracelular dos parasitos em células BeWo também foram determinados quando os mesmos foram tratados previamente com antibióticos (Figura 4).

O índice de infecção da cepa Udi1-CH05 em células BeWo infectadas por parasitos não tratados foi maior quando comparado com Udi2-CH05 (Figura 4A). Por outro lado, para o índice de replicação intracelular não foi observado diferença significativa (Figura 4B). Apenas o tratamento com azitromicina reduziu os índices de infecção e replicação intracelular para ambas as cepas quando comparado com o controle infectado não tratado (Figura 4A e 4B). O tratamento dos parasitos tanto com espiramicina quanto associação de sulfadiazina e pirimetamina não alterou o índice de infecção de nenhuma das cepas, mas reduziu o índice de replicação intracelular apenas na cepa Udi2-CH05 quando comparado com o controle não tratado (Figura 4A e 4B). Em todos os tratamentos, a comparação entre as cepas mostra que tanto o índice de infecção quanto de replicação intracelular foram maiores quando as células estavam infectadas com Udi1-CH05 (Figura 4A e 4B).

O índice de inibição da infecção e da replicação também foi avaliado, como mostra a tabela 2. Nas células infectadas pela cepa Udi1-CH05, apenas o tratamento dos parasitos com azitromicina diminuiu o índice de infecção quando comparado com o controle infectado não tratado (23,22%). A azitromicina foi mais eficaz em inibir a infecção que a espiramicina e a associação de sulfadiazina e pirimetamina. O mesmo foi observado quando parasitos da cepa Udi2-CH05 foram tratados com a azitromicina (índice de inibição de 25,94%). Houve aumento significativo da inibição da replicação intracelular da cepa Udi1-CH05 quando tratada com azitromicina (21,37%). Para essa cepa, o tratamento com azitromicina inibiu mais a replicação do que os demais medicamentos. Todos os tratamentos foram capazes de inibir a replicação intracelular da cepa Udi2-CH05 quando comparados com o controle infectado não tratado e a azitromicina (30,10%) foi mais eficaz nessa inibição que a espiramicina (21,91%).

5.4. Produção de citocinas em células BeWo infectadas e tratadas

Com os sobrenadantes coletados foram realizados ensaio de ELISA para avaliar a produção das citocinas IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β (Figura 5). Observamos que não houve diferença significativa na produção de IL-12 entre células do controle não infectado e não tratado com células do controle não infectado e tratado independente do medicamento (Figura 5A). Entretanto, a infecção tanto pela cepa Udi1-CH05 quanto pela cepa Udi2-CH05 aumentou a produção de IL-12 quando comparadas com células do controle não infectado não tratado. O tratamento com azitromicina ou espiramicina aumentou a produção de IL-12 nas células infectadas com Udi1-CH05 quando comparados com células do controle não infectado e tratado. Durante a infecção por essa cepa, o tratamento com a associação de sulfadiazina e pirimetamina diminuiu a produção de IL-12 quando comparado com as células do controle infectado não tratado ou com células infectadas e tratadas com azitromicina. Por outro lado, durante a infecção pela cepa Udi2-CH05, observamos diminuição da produção de IL-12 em células tratadas com espiramicina quando comparadas com células do controle não infectado tratado. Para todos os tratamentos, observamos redução da produção de IL-12 quando comparados com células do controle infectado não tratado. Com a comparação entre as cepas submetidas ao mesmo tratamento, observamos redução na produção de IL-12 nas células infectadas por Udi2-CH05 e tratadas com azitromicina (Figura 5A).

A produção de TNF- α não foi alterada nas células do controle não infectado não tratado quando comparado com as células do controle não infectado e tratado independente do medicamento (Figura 5B). No entanto, com a infecção pela cepa Udi1-CH05, observamos redução na produção de TNF- α apenas pelas células do controle infectado não tratado e pelas células infectadas e tratadas com azitromicina quando comparadas com seus respectivos controles. Não observamos diferença significativa na produção de TNF- α pelas células infectadas com Udi2-CH05, tanto para as células do controle infectado não tratado, quanto para as células infectadas e tratadas com qualquer um dos medicamentos quando comparadas aos seus respectivos controles. Observamos que o tratamento com associação de sulfadiazina e pirimetamina nas células infectadas com Udi2-CH05 aumentou a produção de TNF- α quando comparadas com as células do controle infectado não tratado ou células

infectadas e tratadas com azitromicina. Na comparação entre as cepas, apenas para as células submetidas ao tratamento com associação de sulfadiazina e pirimetamina foi observado diferença significativa, com maior produção de TNF- α pelas células infectadas com a cepa Udi2-CH05 (Figura 5B).

A produção de IL-10 por células não infectadas e tratadas, independente do medicamento, foi estatisticamente menor quando comparada com células do controle não infectado não tratado (Figura 5C). Entretanto, ao comparar células sem infecção e tratadas com células infectadas e tratadas, a produção de IL-10 foi aumentada significativamente por ambas as cepas. Observamos diminuição de IL-10 nas células infectadas com Udi1-CH05 e tratadas com espiramicina quando comparadas com células do controle infectado não tratado. Além disso, observamos redução da produção de IL-10 apenas nas células infectadas por Udi2-CH05 e tratadas com associação de sulfadiazina e pirimetamina se comparadas com células infectadas por Udi1-CH05 submetidas ao mesmo tratamento (Figura 5C). A produção de TGF- β não foi alterada em nenhuma das situações (Figura 5D).

6. DISCUSSÃO

Formas graves de toxoplasmose ocular e congênita estão relacionadas com a infecção por cepas atípicas (AJZENBERG et al., 2009; BOUGHATTAS et al., 2011). Os sinais clínicos da toxoplasmose congênita se apresentam de várias formas, dependendo da cepa do parasito, da resposta imune materna e da idade gestacional em que ocorre a infecção (SIBLEY et al., 2009; CARLIER et al., 2012). Os medicamentos já utilizados para o tratamento da toxoplasmose apresentam bons resultados em evitar a infecção congênita, contudo, desencadeiam efeitos colaterais indesejáveis, tanto para a mãe quanto para o feto (MONTROYA; REMINGTON 2008; KAYE, 2011).

No presente estudo investigou-se a susceptibilidade de células BeWo à infecção por cepas atípicas de *T. gondii* e o efeito dos tratamentos com azitromicina, espiramicina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina no índice de infecção e replicação dos parasitos.

Azitromicina e espiramicina já foram utilizadas no tratamento de células BeWo infectadas pela cepa virulenta RH de *T. gondii* (FRANCO et al., 2011). Com base nesse estudo, as concentrações desses medicamentos utilizadas neste trabalho foram definidas. Apesar de existirem estudos *in vitro* que utilizam associação entre sulfadiazina e pirimetamina, a concentração de cada uma não é bem estabelecida. Assim, foi utilizada a proporção de 25µg/ml de sulfadiazina para 1µg/ml de pirimetamina de acordo com dados encontrados na literatura (DEROUIN; CHASTANG, 1989; MENECEUR et al., 2008; JIN et al., 2009).

Nas células BeWo, as concentrações a partir de 400µg/ml, independentemente do medicamento, foram tóxicas. Concentrações altas de sulfadiazina e pirimetamina já foram consideradas tóxicas em experimentos *in vitro* utilizando outras linhagens celulares (JIN et al., 2009; ROSSI et al., 2007). Os antibióticos macrolídeos também estão relacionados com a citotoxicidade de acordo com aumento da concentração do medicamento em culturas de células do fígado e fibroblastos (VILUKSELA et al., 1996; MILLROSE et al., 2009). O mesmo foi observado em células trofoblásticas da linhagem BeWo (FRANCO et al., 2011). Uma vez estabelecidas as concentrações menos tóxicas, a concentração intermediária de 100 µg/ml foi escolhida para a realização dos experimentos.

No presente estudo, a cepa Udi1-CH05 infectou mais as células BeWo do que a cepa Udi2-CH05, pois apresentou maior índice de invasão e replicação intracelular de *T. gondii*. Essa diferença entre as cepas pode estar relacionada a fatores de virulência, já que existe diferença na expressão de moléculas que diferenciam as cepas quanto à virulência (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Após o tratamento das células, observamos que a azitromicina controlou os índices de infecção e replicação intracelular para ambas as cepas, enquanto que a espiramicina reduziu o índice de infecção e replicação intracelular da cepa Udi1-CH05 e a associação de sulfadiazina e pirimetamina, diminuiu a replicação da cepa Udi2-CH05. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que azitromicina possui um papel importante contra *T. gondii* porque consegue inibir a replicação do parasito e a mortalidade de camundongos infectados (DEGERLIN et al., 2003; ZHAO et al., 2010; FRANCO et al., 2011). A transmissão vertical e ocular de *T. gondii* também foi diminuída depois do tratamento com esse macrolídeo (COSTA et al., 2009; LOPES et al., 2009). Da mesma forma, neste trabalho, a azitromicina se mostrou eficaz para controlar o parasitismo das cepas atípicas utilizadas.

Sulfadiazina e pirimetamina são medicamentos que atuam inibindo enzimas que irão impedir a duplicação do DNA do parasito durante a fase aguda da infecção. Os macrolídeos impedem a formação dos peptídeos, e consequentemente a tradução de proteínas, ao se ligaram no ribossomo do patógeno (SHINKAI et al., 2008; STEEL et al., 2012). Assim, esses medicamentos atuam diretamente no patógeno. Para verificar se os medicamentos tinham efeito direto nas cepas atípicas estudadas, os parasitos de ambas as cepas foram tratados antes da infecção de células BeWo. Observamos que a azitromicina inibiu significativamente os índices de infecção e replicação intracelular em células infectadas tanto com parasitos tratados da cepa Udi1-CH05 quanto da cepa Udi2-CH05, enquanto que espiramicina e associação de sulfadiazina e pirimetamina controlaram o parasitismo somente da cepa Udi2-CH05. O fato de os tratamentos convencionais não controlarem o parasitismo na cepa Udi1-CH05 pode estar relacionado à resistência do parasito a esses medicamentos, uma vez que já foi demonstrado que algumas cepas de *T. gondii* apresentam resistência natural a sulfadiazina (ASPINALL et al., 2002; MENECEUR et al., 2008).

Durante a gestação, é necessário haver um balanço entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (CHALLIS et al., 2009). A resposta imune durante a

infecção por *T. gondii* é predominantemente pró-inflamatória. IL-12, IFN- γ e TNF- α são essenciais no controle da infecção por patógenos intracelulares como *T. gondii* (PIFER; YAROVINSKY, 2011; KORNER et al., 2010). Contudo, um perfil de reposta inflamatória durante a infecção por *T. gondii*, de modo exacerbado na gravidez, pode resultar em rejeição do feto, podendo levar ao aborto (SILVA; LANGONI, 2009).

T. gondii pode evadir da reposta imune do hospedeiro através de fatores de virulência que conseguem controlar a produção de citocinas. São esses fatores que levam a significantes diferenças entre a virulência das cepas do parasito (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Cepas de virulência moderada induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de NF- κ B, importante fator de transcrição para citocinas pró-inflamatórias. Dessa maneira, essas cepas de *T. gondii* conseguem coexistir com o hospedeiro, estabelecendo uma infecção crônica (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Cepas virulentas modulam o sistema imune por apresentarem ROP16 que está relacionada com a fosforilação de sinais de transdução e ativação de transcrição (STAT) 3 e 6, que irão diminuir a expressão de IL-12, reduzindo a inflamação e a patologia (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012; HUNTER; SIBLEY, 2012). Além disso, cepas virulentas induzem a expressão de supressores de sinalização de citocinas-1 (SOCS-1) que irão inibir a sinalização de STAT1, regulando a sinalização de IFN- γ (STUTZ et al., 2012). Assim, essas cepas reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias permitindo o aumento da proliferação do parasito no hospedeiro. IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que está relacionada com a diferenciação de células Th1 e indução de IFN- γ (VIGNALI; KUCHROO, 2012). Portanto, desempenha papel importante no controle da infecção por *T. gondii* (DOGRUMAN-AL et al., 2011; PIFER; YAROVINSKY, 2011). No presente estudo, as cepas atípicas utilizadas induziram aumento da produção de IL-12, portanto, a redução do parasitismo pela cepa Udi2-CH05, não está relacionada com essa citocina, uma vez que foi observado aumento da produção dessa citocina em ambas as cepas.

A inibição de citocinas pró-inflamatórias por *T. gondii* está relacionada com uma modulação negativa de NF- κ B pelo parasito (DENKERS, 2004). A expressão de ácidos graxos nos taquizoítas é uma das maneiras de *T. gondii* prevenir a ativação de NF- κ B, inibindo a síntese de TNF- α , facilitando a infecção (DEBIERRE-GROCKIEGO,

2010; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). Por outro lado, o aumento da expressão de TNF- α pelas cepas de virulência moderada, está relacionado com a habilidade em induzir, no hospedeiro, respostas pró-inflamatórias, resultando na diferenciação de taquizoítas em bradizoítas, uma vez que já foi demonstrado que TNF- α está relacionada com o aumento da formação de cistos (RICARD et al., 1996; SKARIAH et al., 2010). Neste trabalho, a produção de TNF- α está relacionada ao parasitismo pelas cepas atípicas e não ao tratamento, uma vez que não foi observado diferença significativa na produção desta citocina pelas células não infectadas e tratadas, independente do medicamento, comparadas com células do controle não infectado não tratado. A expressão dessa citocina foi menor durante a infecção pela cepa Udi1-CH05, o que pode estar relacionado com a maior virulência dessa cepa nas células BeWo.

IL-10 e TGF- β 1 são importantes no desenvolvimento do feto semi-alógeno. IL-10 promove implantação e desenvolvimento do feto enquanto que TGF- β exerce papel importante no processo de invasão do trofoblasto (ORTIZ-ALEGRÍA et al., 2010; LI et al., 2012). Além disso, essas citocinas são importantes contra rejeição do feto pelo sistema imune materno porque promovem a diferenciação de células T reguladoras (Treg) que são capazes de regular negativamente, tanto citocinas do perfil Th1 quanto do perfil Th2, permitindo o balanço entre citocinas anti e pró-inflamatórias necessárias durante a gestação (WARNING et al., 2011; ERNERUDH et al., 2011; CLARK; CHAOUAT, 2012). Contudo, a expressão dessas citocinas pode aumentar a susceptibilidade à infecção de patógenos intracelulares (CHALLIS et al., 2009).

T. gondii consegue invadir e replicar nas células BeWo, especialmente quando elas são estimuladas com IL-10 e TGF- β 1 (BARBOSA et al., 2008). Essas citocinas controlam a infecção de *T. gondii* pela inibição de citocinas pró-inflamatórias (GADDI et al., 2007; COUPER et al 2008). IL-10, por exemplo, controla a síntese de IFN- γ em linfócitos e células NK, prevenindo uma resposta imune na presença de *T. gondii* e ao mesmo tempo contribuindo para o sucesso da gestação (SILVA; LANGONI, 2009). No presente estudo observamos aumento na produção de IL-10 após a infecção pelas cepas atípicas, que pode ser outro mecanismo que os parasitos utilizam para evadir da resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, TGF- β 1 parece não ser importante nesse modelo experimental, uma vez que não houve alteração de sua expressão.

Macrolídeos pertencem a uma classe de antibióticos que desempenham um papel importante no tratamento de doenças infecciosas. Esses antibióticos exercem tanto atividades anti-inflamatórias quanto imunomodulatórias (MIN et al., 2012; KWIATKOWSKA; MAŚLIŃSKA, 2012). Macrolídeos inibem a ativação de vias de sinalização pró-inflamatória, como NF- κ B, e também são capazes de inibir a fosforilação dos sinais extracelulares regulados por quinase (ERK), que também são importantes para a expressão de citocinas pró-inflamatórias (GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2008; SRIVASTAVA et al., 2011; HIWATASHI et al., 2011). Dessa forma, estudos mostram que azitromicina e espiramicina inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12 e IL-1 β e induz expressão de citocinas anti-inflamatórias (MOUTARD et al., 1999; CAI et al., 2012; BANJANAC et al., 2011; FRANCO et al., 2011; BOSNAR et al., 2011). No presente estudo, observamos que a redução do parasitismo da cepa Udi1-CH05 pelo tratamento com azitromicina não está relacionado com a ação das citocinas analisadas. Já a redução do parasitismo da cepa Udi2-CH05 por azitromicina pode estar relacionada com a diminuição da produção de IL-12 observada nas células infectadas e tratadas em relação com células não tratadas.

A diversidade de cepas é uma estratégia evolutiva que pode ter um impacto nas características biológicas relacionadas com parâmetros biomédicas, tais como a virulência e resistência às drogas. Existem muitos estudos que demonstram a variedade de cepas atípicas, tanto no Brasil como em outros países. Porém, esses estudos estão relacionados com genotipagem dessas cepas (KHAN et al., 2011; SU et al., 2012; PENA et al., 2013; CARNEIRO et al., 2013; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013).

A relação parasito/hospedeiro de cepas atípicas ainda não está estabelecida. Dessa forma, a maior susceptibilidade das células BeWo à infecção pela cepa Udi1-CH05 pode estar relacionada com a diminuição da produção de TNF- α pela cepa. Além disso, a redução do parasitismo dessa cepa pelos medicamentos, não está relacionada com as citocinas analisadas, mas com mecanismos da cepa de manter a infecção. Por outro lado, a redução do parasitismo da cepa atípica Udi2-CH05 pelo tratamento com azitromicina pode estar relacionada com a diminuição da produção de IL-12. Assim, esse trabalho demonstrou que células BeWo são mais susceptíveis à infecção pela cepa Udi1-CH05 do que pela cepa Udi2-CH05 de *T. gondii* e que o tratamento com

azitromicina foi mais eficiente em controlar a infecção e replicação do parasito do que os tratamentos convencionais utilizados.

7. CONCLUSÕES

- Azitromicina, espiramicina e a associação de sulfadiazina e pirimetamina apresentam citotoxicidade para as células BeWo em concentrações a partir de 400µg/mL ;
- A cepa Udi1-CH05 infecta mais as células BeWo que a cepa Udi2-CH05 e o tratamento das células infectadas com azitromicina foi capaz de controlar tanto o índice de infecção quanto de replicação intracelular das duas cepas;
- Os parasitos de ambas as cepas quando foram tratados previamente à infecção, apresentaram maior susceptibilidade ao tratamento com azitromicina apresentando menores índices de infecção e replicação em relação aos outros medicamentos.
- A produção das citocinas IL-12, TNF- α e IL-10 por células BeWo infectadas está relacionada com a infecção pelas cepas Udi1-CH05 e Udi2-CH05 e não com os medicamentos utilizados.

Figura 1

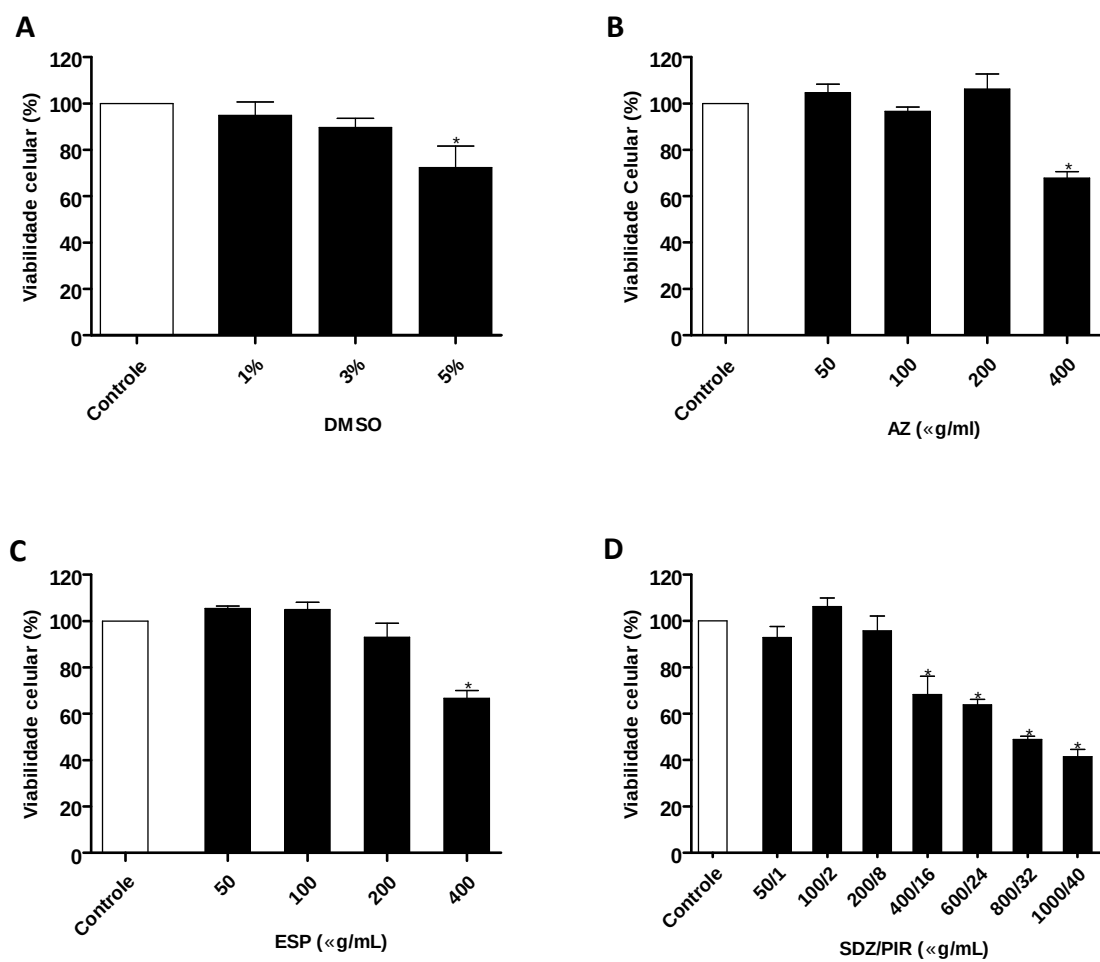


Figura 2

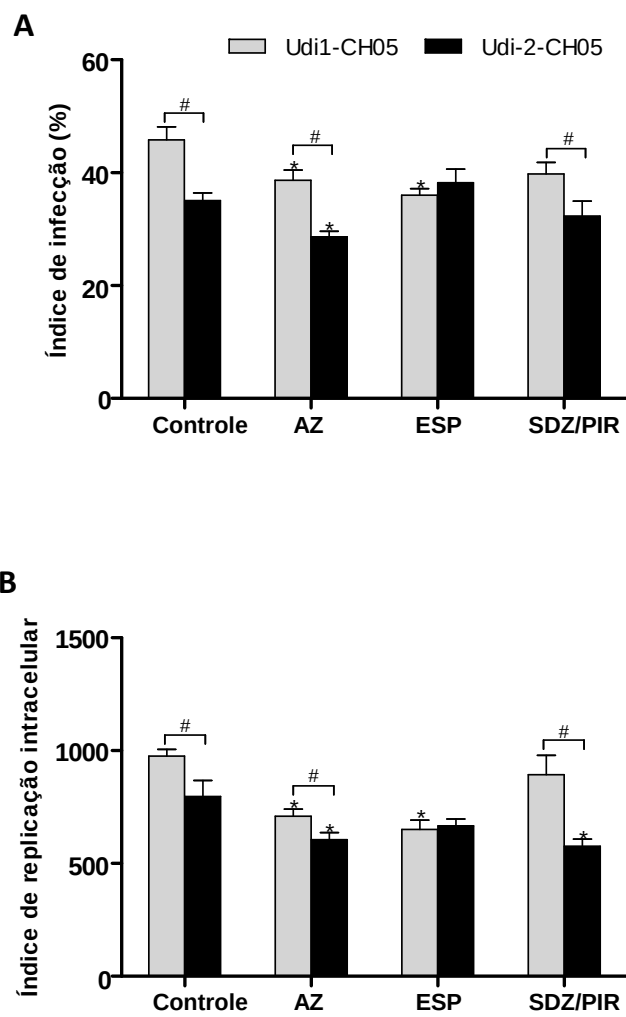


Figura 3

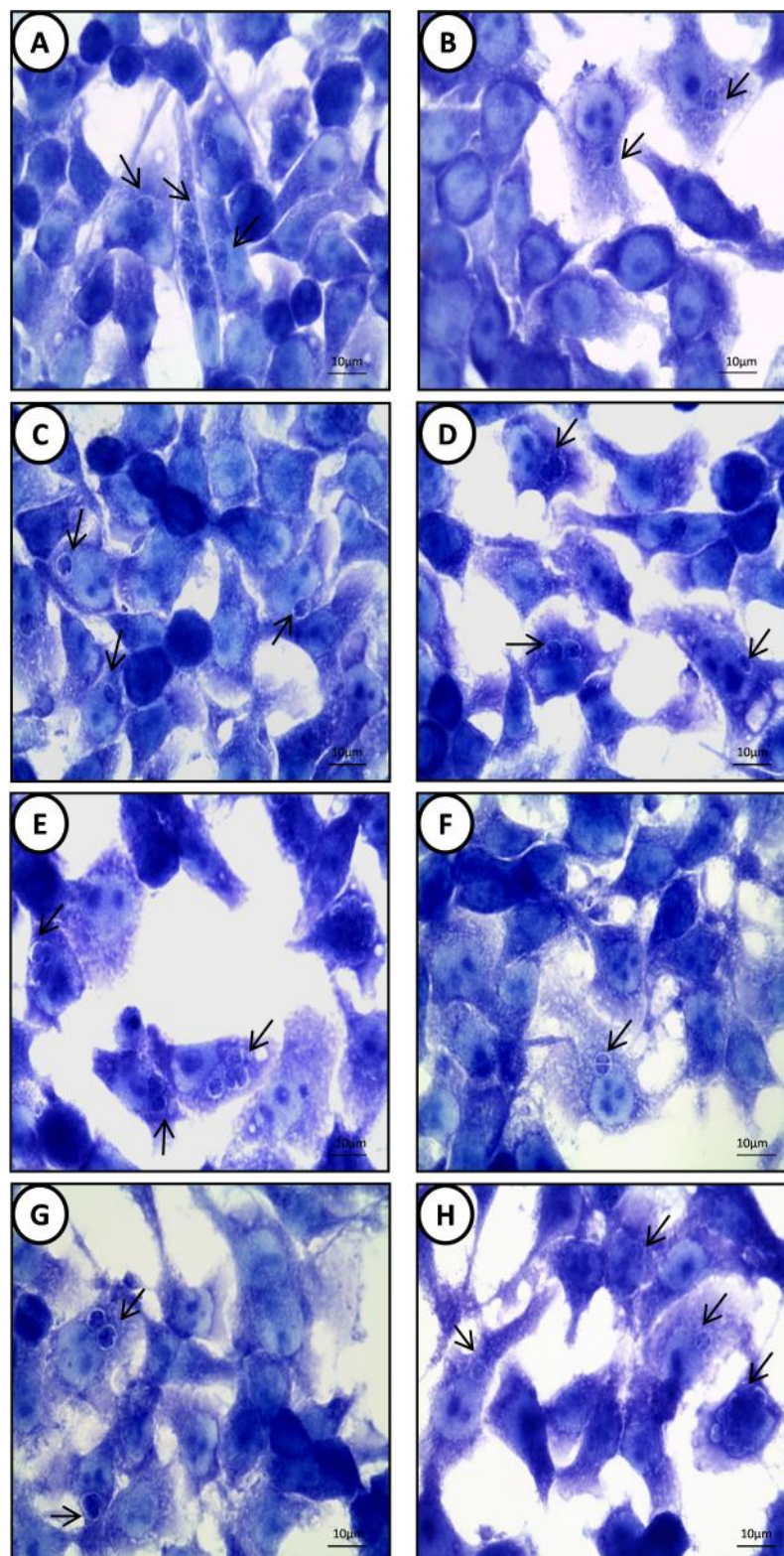


Figura 4

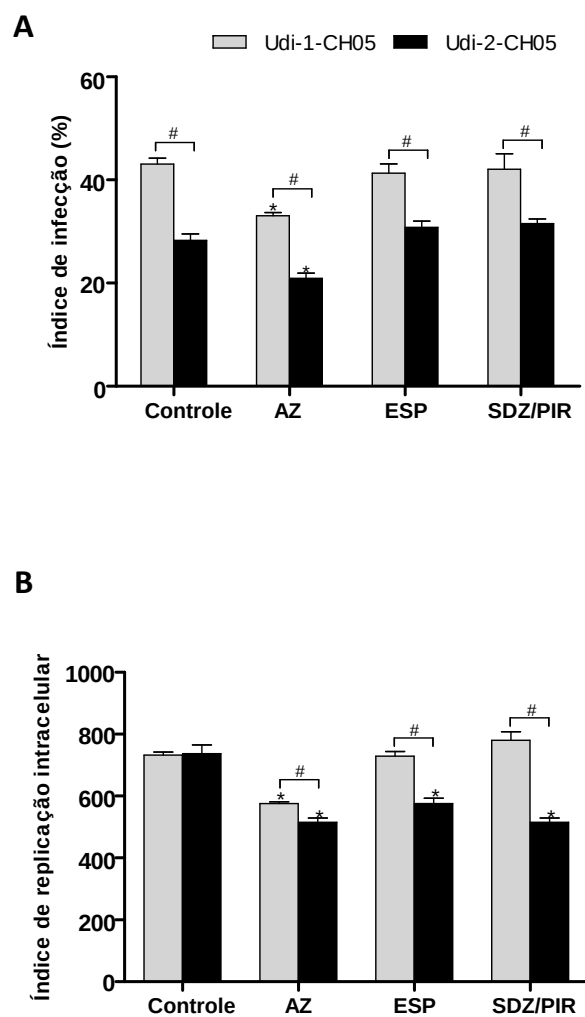


Figura 5

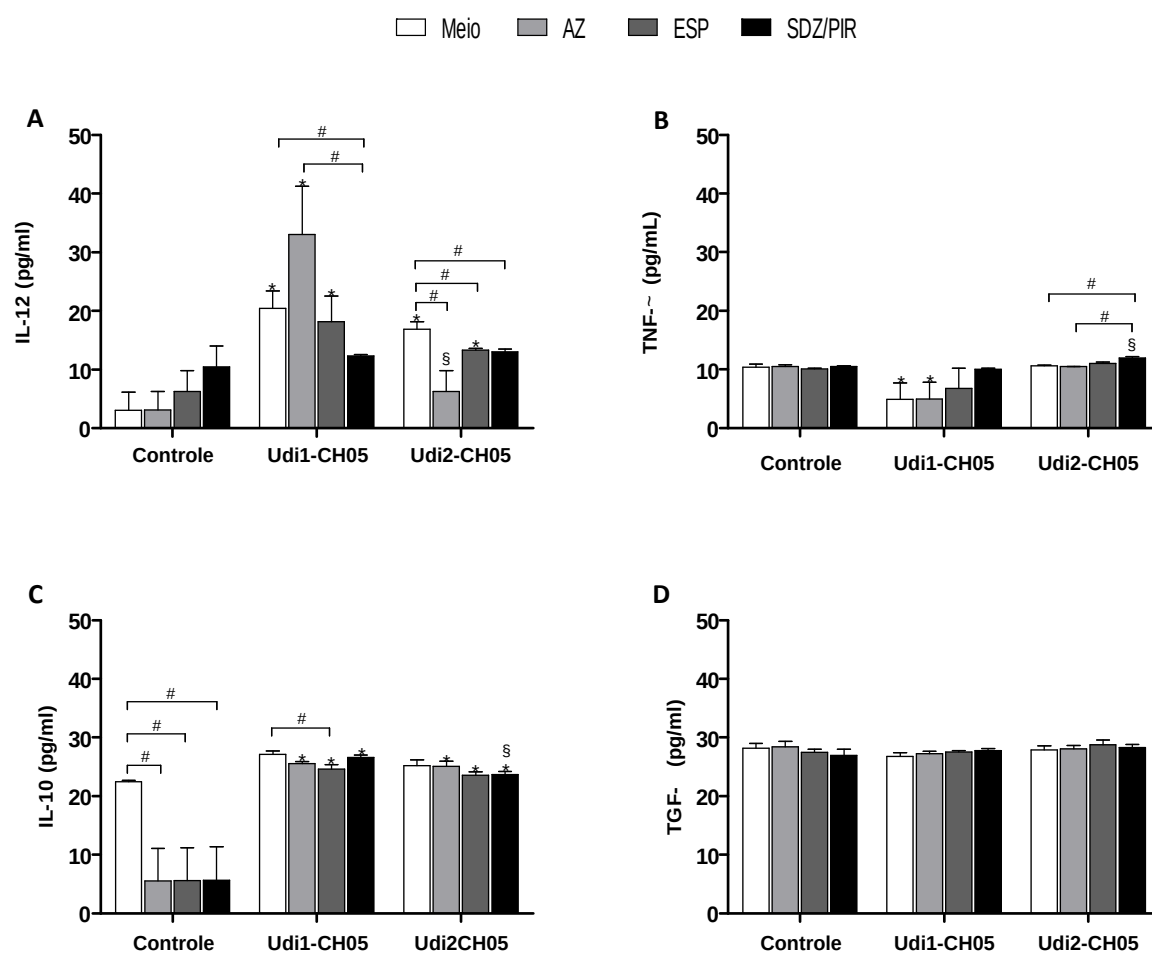


Tabela 1

Índice de infecção e replicação intracelular em células BeWo representadas pelo número total (média $\pm$ SEM) e índice de inibição (%) após o tratamento das células.

Tratamento (antibióticos)	Índice de infecção (mean $\pm$ SEM)	Índice de infecção da infecção (%) ^a	Replicação intracelular (mean $\pm$ SEM)	Índice de inibição da replicação intracelular (%) ^a
Udi1-CH05				
Controle	45,83 $\pm$ 2,291	-	975,8 $\pm$ 30,31	-
AZ (100 μ g/ml)	38,67 $\pm$ 1,810 *	15,62%	709,0 $\pm$ 32,00 *	27,34%
ESP (100 μ g/ml)	36,00 $\pm$ 1,164 *	21,44%	650,4 $\pm$ 41,11 *	33,34%
SDZ/PIR (100 μ g/ml)	39,78 $\pm$ 2,065 *	13,2%	893,0 $\pm$ 86,77	8,48%
Udi2-CH05				
Controle	35,06 $\pm$ 1,358	-	796,3 $\pm$ 71,78	-
AZ (100 μ g/ml)	28,61 $\pm$ 1,016 *	18,39%	606,0 $\pm$ 31,42 *	23,89%
ESP (100 μ g/ml)	38,22 $\pm$ 2,413 #	+9%	666,7 $\pm$ 30,60	16,27%
SDZ/PIR (100 μ g/ml)	32,33 $\pm$ 2,629	7,78%	576,4 $\pm$ 31,84 *	27,61%

^a A média do número total de invasão celular e replicação intracelular em células não tratadas corresponde a 100% do índice de infecção e proliferação, respectivamente, a porcentagem de redução do índice de infecção e replicação intracelular depois do tratamento com azitromicina (AZ), espiramicina (ESP) e associação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ/PIR) foi calculado subtraindo os valores de células tratadas obtidos de células não tratadas.

* Comparação de células tratadas com o controle (One Way ANOVA e pós-teste de Dunnett, $P < 0,05$).

Comparação do tratamento com azitromicina e os demais tratamentos para cada cepa (teste t student, $P < 0,05$).

Tabela 2

Índice de infecção e replicação intracelular em células BeWo representadas pelo número total (média $\pm$ SEM) e índice de inibição (%) após o tratamento dos parasitos.

Tratamento	Medicamentos (100 μ g/ml)	Índice de infecção (mean $\pm$ SEM)	Índice de infecção da infecção (%) ^a	Replicação intracelular (mean $\pm$ SEM)	Índice de inibição da replicação intracelular (%) ^a
Udi1-CH05					
Controle		43,08 $\pm$ 1,16	-	731,7 $\pm$ 10,47	-
AZ		33,08 $\pm$ 0,59 *	23,22%	575,3 $\pm$ 5,73 *	21,37%
ESP		41,33 $\pm$ 1,78 [#]	4,06%	728,7 $\pm$ 15,19 [#]	0,41%
SDZ/PIR		42,08 $\pm$ 3,00 [#]	2,32%	758,8 $\pm$ 19,80 [#]	+3,7%
Udi2-CH05					
Controle		28,25 $\pm$ 1,270	-	736,8 $\pm$ 28,50	-
AZ		20,92 $\pm$ 1,003 *	25,94%	515,0 $\pm$ 13,67 *	30,10%
ESP		30,83 $\pm$ 1,195 [#]	+9%	575,3 $\pm$ 17,61 ^{*/#}	21,91%
SDZ/PIR		31,50 $\pm$ 0,9220 [#]	+11%	515,2 $\pm$ 13,26 *	30,07%

^a A média do número total de invasão celular e replicação intracelular em células não tratadas corresponde a 100% do índice de infecção e replicação intracelular, respectivamente. A porcentagem de redução do índice de infecção e replicação intracelular depois do tratamento com azitromicina (AZ), espiramicina (ESP) e associação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ/PIR) foi calculado subtraindo os valores de células tratadas obtidos de células não tratadas.

* Comparação de células tratadas com o controle (One Way ANOVA e pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$).

[#] Comparação do tratamento com azitromicina e os demais tratamentos para cada cepa (teste *t student*, $p < 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n°3, p. 1397-401, Mar., 2004.

AJZENBERG, D.; YERA, H.; MARTY, P.; PARIS, L.; DALLE, F.; MENOTTI, J.; AUBERT, D.; FRANCK, J.; BESSIÈRES, M.; QUINIO, D.; PELLOUX, H.; ELHAES, 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.

ALIBERT, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 5, n° 2, p. 162-70, Feb, 2005.

ANDERSON, A.C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. **Drug discovery today**, Oxford, v.10, n°2, p.121-8, Jan., 2005.

ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. **Arthritis Research & Therapy**, London, v.11, n° 6, p. 1-8, 2009.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 192, n° 2, p. 259-70, Jul., 2000.

ASPINALL, T.V.; JOYNSON, D.H.; GUY, E.; HYDE, J.E.; SIMS, P.F. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.185, n°11, p.1637-43, Jun., 2002.

BANJANAC, M.; MUNIĆ KOS, V.; NUJIĆ, K.; VRANČIĆ, M.; BELAMARIĆ, D.; CRNKOVIĆ, S.; HLEVNJAK, M.; ERAKOVIĆ HABER, V. Anti-inflammatory mechanism of action of azithromycin in LPS-stimulated J774A.1 cells. **Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v.66, n°4, p.357-62, Oct., 2012.

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.152, n°3, p.536-45, Mar., 2008.

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

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**, United States, v. 3, n° 3, p. 190-98, Sep., 1997.

BLADER, I.J.; SAEIJ, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, Copenhagen, v.117, n°6, p.458-76, May, 2009.

BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* – state of the art. **Annals of Agricultural and Environment Medicine**, Lublin, v.17, n°2, p. 209–14, Dec., 2010.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and it's 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.; ČUŽIĆ, S.; BOŠNJAK, B.; NUJIĆ, K.; ERGOVIĆ, G.; MARJANOVIĆ, N.; PAŠALIĆ, I.; HRVAČIĆ, B.; POLANČEC, D.; GLOJNARIĆ, I.; ERAKOVIĆ HABER, V. Azithromycin inhibits macrophage interleukin-1 β production through inhibition of activator protein-1 in lipopolysaccharide-induced murine pulmonary neutrophilia. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v.11, n°4, p.424-34, Apr., 2011.

BOTTÓS, J.; MILLER, R.H.; BELFORT, R.N.; MACEDO, A.C.; UNIFESP TOXOPLASMOSIS GROUP; BELFORT, R. JR.; GRIGG, M.E. Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of *Toxoplasma gondii*. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 93, n°11, p.1546-50, Nov., 2009.

BOUGHATTAS, S.; ABDALLAH, R.B.; SIALA, E.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia. **The New Microbiológica**, Pavia, v.34, n°4, p.413-6, Oct., 2011.

CAI, M.; BONELLA, F.; DAI, H.; SARRIA, R.; GUZMAN, J.; COSTABEL, U. Macrolides inhibit cytokine production by alveolar macrophages in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. **Immunobiology**, Amsterdam, Nov., 2012. doi:pii: S0171-2985(12)00524-4. 10.1016/j.imbio.2012.10.014.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.121, n°2, p.55-70, Feb., 2012.

CARNEIRO, A.C.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.D.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N.; VITOR, R.W. Genetic characterization of

Toxoplasma gondii revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis insoutheastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, Washington, Jan., 2013.

CASTRO, A.S.;ALVES, C.M.;ANGELONI, M.B.;GOMES, A.O.;BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.;MARTINS-FILHO, O.A.;MINEO, J.R.;MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection.**Placenta**,London,Jan.,2013.doi:pII:S0143-4004(12)00498-5. 10.1016/j.placenta.2012.12.006.

CHALLIS, J. R., LOCKWOOD, C. J., MYATT, L., NORMAN, J. E., STRAUSS, J. F. 3rd, PETRAGLIA, F..Inflammation and pregnancy.**Reproductive Sciences**, California, v.16, n°2, p.206-15, Feb., 2009.

CLARK, D.A.; CHAOUAT, G. Regulatory T cells and reproduction: how do they do it? **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v.96, n°1-2, p.1-7, Dec., 2012.

CLEMENTINO ANDRADE, M.M.; PINHEIRO, B.V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A.C.; ANDRADE NETO, V.F.; VITOR, R.W. New gentotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, London, Feb., 2013. doi:pII: S0034-5288(13)00008-8.10.1016/j.rvsc.2013.01.006.

COSTA, I.N.; ANGELONI, M.B.; SANTANA, L.A.; BARBOSA, B.F.; SILVA, M.C.; RODRIGUES, A.A.; ROSTKOWSA, C.; MAGALHÃES, P.M.; PENA, J.D.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomyscallosus*(Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, London, v.30, n°10, p.884-90, 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. 5771–77, May, 2008.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Glycolipids are potential targets for protozoan parasitediseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.26, n°8, p.404-11, Aug., 2010.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; RABI, K.; SCHMIDT, J.; GEYER, H.; GEYER, R.; SCHWARZ, R.T. Fatty acids isolated from *Toxoplasma gondii* reduce glycosylphosphatidylinositol-induced tumor necrosis factor a production through inhibition of the NF- κ B signaling pathway. **Infection and Immunity**, Washington, v.75, n°6, p. 2886-93, Jun., 2007.

DEĞERLI, K.; KILIMCIOĞLU, A.A.; KURT, O.; TAMAY, A.T.; OZBILGIN, A. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. **ActaTropica**, Amsterdam, v.88, n°1, p.45-50, Sep., 2003.

DEKEL, N.; GNAINSKY, Y.; GRANOT, I.; MOR, G. Inflammation and implantation.**American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.63, n°1, p.17-21, Jan., 2010.

DENKERS, E.Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **Journal of biomedicine & biotechnology**, Ohio, v. 2010, p.1-7, 2010.

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.11, n°4, p.569-88, Oct., 1998.

DEROUIN, F.; CHASTANG, C. In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.33, n°10, p.1753-9, Oct., 1989.

DOGRUMAN-AL, F.; FIDAN, I.; CELEBI, B.; YESILYURT, E.; ERDAL, B.; BABUR, C.; KUSTIMUR, S. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Singapore, v.4, n°1, p.16-9, Jan., 2011.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n°2, p.267-99. Apr., 1998.

DUBEY, J.P.; LAGO, E.G.; GENNARI, S.M.; SU, C.; JONES, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, London, v.139, n°11, p.1375-424, Sep., 2012.

DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, Paris, v.14, n°15, p.1403-10, Dec., 2012.

DUPONT, C.D.; CHRISTIAN, D.A.; HUNTER, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, Germany, v.34, n°6, p.793-813, Nov., 2012.

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

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.126, n° 2-3, p. 79-94, Feb., 2002.

ERNERUDH, J.; BERG, G.; MJÖSBORG, J. Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.1, p.31-43, Jul., 2011.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.26, n°1, p.58-85, Jan., 2013.

FERGUSON, D.J.; BOWKER, C.; JEFFERY, K.J.; CHAMBERLAIN, P.; SQUIER, W. Congenital toxoplasmosis: continued parasite proliferation in the fetal brain despite maternal

immunological control in other tissues. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.56, n°2, p.204-8, Jan., 2013.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R.W.A.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v.6, n°1, p. 22–31, Jan., 2006.

FERREIRA, I.M.; VIDAL, J.E.; COSTA-SILVA, T.A.; MEIRA, C.S.; HIRAMOTO, R.M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A.C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR–RFLP markers. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.118, n°2, p.221-7, Feb., 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.

FRANCO, P.S.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, London, v. 32, n°11, p.838-44, Nov., 2011.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J.P.; GRIGG, M.E.; OLIVEIRA, F.C.R. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.175, n°1-2, p. 33–9, Jan., 2011.

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukin IL-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, London, v. 21, n°4, p. 354 – 60, May, 2000.

FURTADO, J.M.; BHARADWAJ, A.S.; ASHANDER, L.M.; OLIVAS, A.; SMITH, J.R. Migration of *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells across human retinal vascular endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v.53, n°11, p.6856-63, Oct., 2012.

GADDI, P.J.; YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, London, v.85, n°2, p.155-9, Mar., 2007.

GEE, K.; GUZZO, C.; CHE MAT, N.F.; MA, W.; KUMAR, A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. **Inflammation & allergy drug targets**, Sharjah, v. 8, n°1, p.40-52, Mar., 2009.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J. Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.31, n°1, p.12-20, Jan., 2008.

GIGLEY, J. P.; BHADRA, R.; KHAN, I. A. CD8 T cells and *Toxoplasma gondii*: a new paradigm. **Journal of Parasitology Research**, New York, v.2011, p. 1-9, 2011.

GRÜMMER, R.; WINTERHAGER, E. Blastocyst-mediated induction of endometrial connexins: an inflammatory response? **Journal of Reproductive Immunology**, Limerick, v. 90, p. 9-13, Jun., 2011.

GUBBELS, M.J.; DURAISINGH, M.T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.42, n°12, p.1071-81, Nov., 2012.

HARRIS, L.K. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. **Placenta**, London, v.31, p.93-98, Mar., 2010.

HILL, R.D.; SU, C. High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.187, n°1-2, p.36-43, Jun., 2012.

HIWATASHI, Y.; MAEDA, M.; FUKUSHIMA, H.; ONDA, K.; TANAKA, S.; UTSUMI, H.; HIRANO, T. Azithromycin suppresses proliferation, interleukin production and mitogen-activated protein kinases in human peripheral-blood mononuclear cells stimulated with bacterial superantigen. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.63, n°10, p.1320-6, Oct., 2011.

HUNTER, C.A.; SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.10, n°11, p.766-78, Nov., 2012.

INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses Public Health**, Germany, v. 57, n° 1, p.1-7, Feb., 2010.

JIN, C.; KAEWINTAJUK, K.; JIANG, J.; JEONG, W.; KAMATA, M.; KIM, H.S.; WATAYA, Y.; PERK, H. *Toxoplasma gondii*: a simple high-throughput assay for drug screening in vitro. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.121, n°2, p.132-6, Feb., 2009.

JOHN, R.; HEMBERGER, M.A. Placenta for life. **Reproductive Biomedicine Online**, Amsterdam, v.25, n°1, p.5-11, Jul., 2012.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.55, n°6, p.845-51, Sep., 2012.

KATO, K.; SUGI, T.; IWANAGA, T. Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. **Parasitology International**, Amsterdam, v.61, n°2, p.224-34, Jun., 2012.

KAYE, A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. **Journal of Pediatric Health Care**, Saint Louis, v. 25, n°6, p.355-364, Dec., 2011.

KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU, C.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. SIBLEY, L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 41, n°6, p. 645–655, May, 2011.

KLAFFENBACH, D.; RASCHER, W.; RÖLLINGHOFF, M.; DÖTSCH, J.; MEISSNER, U.; SCHNARE, M. Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.53, n°2, p.77-84, Feb., 2005.

KOGA, K.; ALDO, P. B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. **Journal of Obstetrics & Gynaecology Research**, Melbourne, v. 35, n°2, p. 191-202, Apr., 2009.

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n° 8, p. 879-88, Jul., 2010.

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n° 8, p. 879-88, 2010.

KWIATKOWSKA, B.; MAŚLIŃSKA, M. Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, Aug., 2012. doi: 10.1155/2012/636157.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v.65, n°12, p. 1900-15, Jun., 2008.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, England, v.12, n° 3, p.292-300, Dec., 2010.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.12, n° 3, p.292-300, Dec., 2010.

LI, Y.; XU, Q.; ZHANG, Z.; LIU, S.; SHI, C.; TAN, Y. The impact of TGF- β 1 on the mRNA expression of T β R I, T β R II, Smad4 and the invasiveness of the JEG-3 placental choriocarcinoma cell line. **Oncology Letters**, Athens, v.4, n°6, p.1344-48, Dec., 2012.

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.

LÜDER, C. G.; STANWAY, R. R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V.T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.39, n°2, Jan., 2009.

MALEK, T. R.; CASTRO, I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. **Immunity**, United States, v.33, n° 2, p. 153-65, Aug., 2010.

MASOCHA, W.; KRISTENSSON, K. Passage of parasites across the blood-brain barrier. **Virulence**, Austin, v.3, n°2, p.202-12, Mar., 2012.

MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M-P.; DARDÉ, M-L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n°7, p. 299–303. Jul., 2008.

MENECEUR, P.; BOULDOUYRE, M.A.; AUBERT, D.; VILLENA, I.; MENOTTI, J.; SAUVAGE, V.; GARIN, J.F.; DEROUIN, F. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington, v. 52, n°4, p. 1269–1277, Apr., 2008.

METZGER, D.W. Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. **Cytokine**, San Diego, v. 52, n°1-2, p. 102–107, Oct., 2010.

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

MILLROSE, M.; KRUSE, M.; FLICK, B.; STAHLMANN, R. Effects of macrolides on proinflammatory epitopes on endothelial cells in vitro. **Archives of Toxicology**, Berlin, v.83, n°5, p.469-76, May, 2009.

MIN, J.Y.; JANG, Y.J. Macrolide therapy in respiratory viral infections. *Mediators of Inflammation*, Sylvania, Jun., 2012; 2012:649570.

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

MOR, G.; CARDENAS, I.; ABRAHAM, V.; GULLER, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Boston, v.1221, p.80-7, Mar., 2011.

MOUTARD, I.; GRESSIER, B.; BONTE, F.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; BALLESTER, L.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C. In vitro effects of spiramycin and dirithromycin on IL1 beta production by human LPS-stimulated mononuclear cells. **Therapie**, Paris, v.54, n°5, p.607-12, Sep., 1999.

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.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESA, M.M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, Oxford, v. 240, n°1, p. 269-85, Mar., 2011.

NAGAMATSU T, SCHUST D.J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.63, n°6, p.460-71, Jun., 2010.

NAM, H. W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 47, p. 29-37, Oct., 2009.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. **Science**, New York, v. 327, p. 1098-102, Feb., 2010.

ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; CAÑEDO-SOLARES, I.; RICO-TORRES, C.P.; SAHAGÚN-RUIZ, A.; MEDINA-ESCUZIA, M.E.; CORREA, D. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. **Genes and Immunity**, Hampshire, v.11, n°5, p.363-73, Jul., 2010.

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.

PENA H.F.J.; GENNARI, S.M; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n° 5, p.561–69, Apr., 2008.

PENA HF, VITALIANO SN, BELTRAME MA, PEREIRA FE, GENNARI SM, SOARES RM. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: new genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.192, n°1-3, p.111-7, Feb., 2013.

PENG, H.J.; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **The Journal of Parasitology**, United States, v.97, n°4, p.620-8, Aug., 2011.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 12, n°3, p.214-223, Jun., 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**, Amsterdam, v. 385, n°4, p. 1179-92, Jan., 2009.

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

POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, Wien, v.162, n°9-10, p.187-90, May, 2012.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J.P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 12, n°2, p.359-68, Mar., 2012.

RAMOS, A. J.; CANTERO, M.R.; ZHANG, P.; RAYCHOWDHURY, M.K.; GREEN, A.; MACPHEE, D.; CANTIELLO, H.F. Morphological and electrical properties of human trophoblast choriocarcinoma, BeWo cells. **Placenta**, London, v.29, n°6, p.492-502, Jun., 2008.

RAMSEY, P.S.; VAULES, M.B.; VASDEV, G.M.; ANDREWS, W.W.; RAMIN, K.D. Maternal and transplacental pharmacokinetics of azithromycin. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v.188, n°3, p.714-8, Mar., 2003.

RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J. C. Secretion of proteins into host cells by apicomplexan parasites. **Traffic**, Oxford, v. 9, n°5, p.647-56, May, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2008. 856p.

RICARD, J.; PELLOUX, H.; PATHAK, S.; PIPY, B.; AMBROISE-THOMAS, P. TNF-alpha enhances *Toxoplasma gondii* cyst formation in human fibroblasts through the sphingomyelinase pathway. **Cell Signaling**, Oxford, v.8, n°6, p.439-42, Sep., 1996.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.25, n°2, p. 264-96, Apr., 2012.

ROSSI, T.; COPPI, A.; BRUNI, E.; RUBERTO, A.; SANTACHIARA, S.; BAGGIO, G. Effects of anti-malarial drugs on MCF-7 and Vero cell replication. **Anticancer Research**, Attiki, v.27, n°4B, p.255-9, Jul., 2007.

SAEI, J.P.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 10, n°21, p. 476-481, Oct., 2005.

SALAMONE, G.; FRACCAROLI, L.; GORI, S.; GRASSO, E.; PAPARINI, D.; GEFFNER, J.; PÉREZ LEIRÓS C.; RAMHORST, R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Human Reproduction**, Oxford, v.27, n°9, p.2598-606, Sep., 2012.

SALMAN, S.; ROGERSON, S.J.; KOSE, K.; GRIFFIN, S.; GOMORAI, S.; BAIWOG, F.; WINMAI, J.; KANDAI, J.; KARUNAJEEWA, H.A.; O'HALLORAN, S.J.; SIBA, P.; ILETT, K.F.; MUELLER, I.; DAVIS, T.M. Pharmacokinetic properties of azithromycin in pregnancy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.54, n°1, p.360-6, 2010.

SALOMÃO, C. L.; SILVA, N. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; SU, C.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. **Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) da cidade de Uberlândia, MG.** 2007. 30f. Monografia (no formato de artigo científico) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2007.

SANECKA, A.; FRICKEL, E.M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, Austin, v.3, n°7, p.678-89, Nov., 2012.

SANTOS, J.M.; LEBRUN, M.; DAHER, W.; SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J.F. Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.39, n°2, p.153-62, Jan., 2009.

SHINKAI, M.; HENKE, M.O.; RUBIN, B.K. Macrolide antibiotics as immunomodulatory medications: proposed mechanisms of action. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v.117, n°3, p.393-405, Mar., 2008.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, New York, v.304, n°5668, p. 248-53, Apr., 2004.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 364, n° 1530, p. 2749–61, Sep., 2009.

SIBLEY, L.D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 21, n°5, p.592-8, Oct., 2010.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.62, p.329-51, 2008.

SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n°4, p. 893-8, Oct., 2009.

SINAGRA, A.L; LUNA, C; ABRAHAM, D.; IANNELLA, M.D.; 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**, Uberaba, v.40, n°6, p. 627-30, 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.253-60, Jul., 2010.

SOARES, R.M.; SILVEIRA, L.H.; SILVA, A.V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E.G.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.178, n°1-2, p.29-34, May, 2011.

SOLDATI-FAVRE, D. Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. **Parasite**, Paris, v. 15, n° 3, p. 197-205, Sep., 2008.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **ScientiaMedica**, Porto Alegre, v. 20, n° 1, p. 131-43, 2010.

SRIVASTAVA,P.; VARDHAN,H.; BHENGRAJ, A.R.; JHA,R.; SINGH,L.C.; SALHAN,S.; MITTAL, A. Azithromycin treatment modulates the extracellular signal-regulated kinase Mediated pathway and inhibits inflammatory cytokines and chemokines in epithelial cells from infertile women with recurrent *Chlamydia trachomatis* infection. **DNA and Cell Biology**, New York, v.30, n°8, p.545-54, Aug., 2011.

STEEL, H.C.; THERON, A.J.; COCKERAN, R.; ANDERSON, R.; FELDMAN, C. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, Jun., 2012. doi: 10.1155/2012/584262.

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M.E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A.H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, Amsterdam, v.217, n°1, p.28-36, Jan., 2012.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.109, n°15, p.5844-9, Apr., 2012.

SULLIVAN, W.J. JR.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v.36, n°3, p.717-33, May., 2012.

SUZUKI, Y.; SA, Q.; GEHMAN, M.; OCHIAI, E. Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v.13, Oct., 2011.

SYKES, L.; MACINTYRE, D.A.; YAP, X.J.; TEOH, T.G.; BENNETT, P.R. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, v.2012, p.1-12, Jun., 2012.

VIGNALI, D.A.; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, New York, v.13, n°8, p.722-8, Jul., 2012.

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.465-73, Sep., 1996.

WARNING, J.C.; MCCracken, S.A.; MORRIS, J.M. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. **Reproduction**, Cambridge, v.141, n°6, p.715-24, Jun., 2011.

YAROVINSKY, F.; SHER, A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.36, n°3, p.255-9, Mar., 2006.

ZHAO, Q.; ZHANG, M.; HONG, L.; ZHOU, K.; LIN, Y. Evaluation of drug effects on *Toxoplasma gondii* nuclear and plastid DNA replication using real-time PCR. **Parasitology Research**, Berlin, v.106, n°5, p.1257-62, Apr., 2010.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2121 – Bloco A- sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38408-144 - FONE (034)3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br

Uberlândia, 23 de setembro de 2011.

MI/PROPP/CEP/UFU/057/11

De: Prof^a. Dr^a. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos

Para: Prof^a. Dr^a. Eloisa Amália Vieira Ferro
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM/UFU

Prezado Senhora,

Com respeito ao protocolo registrado no CEP/UFU sob o nº **249/11: “Análise da produção de citocinas por células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) infectadas por dois isolados de *Toxoplasma gondii* de Uberlândia, MG, Brasil”**, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos observou que a pesquisa não avaliará sujeitos de pesquisa Seres Humanos ou material biológico diretamente doado por seres humanos. Diante dessa observação e pautado na Resolução 196/96-CNS o CEP/UFU informa que não fornecerá parecer para a pesquisa supracitada.

Atenciosamente,

Prof^a. Dr^a. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora CEP/UFU

ANEXO II



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 101/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 049/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus* cronicamente infectados pela cepa ME-49 e reinfetados com isolados Udi-1 CH-05 e Udi-2CH-05".

Pesquisador Responsável: Eloisa Amália Vieira Ferro

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 05 de julho de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU