

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a infecção por
Toxoplasma gondii em células trofoblásticas humanas e em
explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre**

RAFAELA JOSÉ DA SILVA

Uberlândia
Julho, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

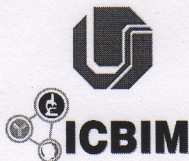
**Enrofloxacina e toltrazuril reduzem a infecção por
Toxoplasma gondii em células trofoblásticas humanas e em
explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre**

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

Aluna: Rafaela José da Silva

Orientadora: Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Uberlândia
Julho, 2016



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Rafaela José da Silva

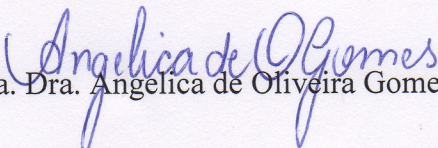
“Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre”

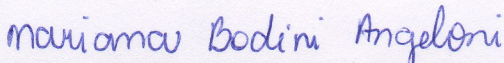
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

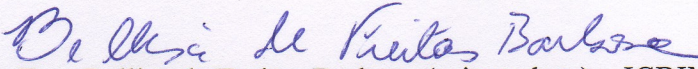
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 22 de julho de 2016.


Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes – UFTM


Profa. Dra. Mariana Bodini Angeloni – UNIPAC


Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa (orientadora) – ICBIM/UFU

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

- S586e
2016 Silva, Rafaela José da, 1991
 Enrofloxacina e toltrazuril reduzem a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre / Rafaela José da Silva. - 2016.
 76 p. : il.
- Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Toxoplasmose congênita - Tratamento - Teses. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983 . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

Neste momento, mais uma etapa de minha vida está sendo cumprida, e dedico este trabalho aos meus pais Alcides e Ivone, e minha irmã Carollina. Embora não estejamos juntos fisicamente, todos os dias, vocês estão juntos comigo em todos os momentos. Sei o quanto vocês torcem pelo meu sucesso que mesmo distante fazem o possível para me ajudar quando eu mais preciso. Reconheço o esforço de vocês para permitirem chegar onde eu cheguei hoje. E eu só tenho a agradecer por todo amor e dedicação!! Espero que consiga retribuir tudo que fizeram por mim.

Agradecimento Especial

Agradeço de todo meu coração a minha orientadora Dra. Bellisa de Freitas Barbosa.

Primeiramente, muito obrigada por me aceitar como sua aluna, pela confiança em mim para o desenvolvimento deste trabalho, pela sua paciência, por todo carinho e atenção durante estes dois anos de mestrado. Agradeço a disponibilidade em me ajudar em todos os momentos, seja dentro do laboratório ou mesmo fora do nosso ambiente de trabalho. Tenho a certeza que além de uma grande orientadora eu tenho uma grande amiga. Tenho muito carinho e admiração pela sua pessoa, pois possui de inúmeras qualidades, e é muito competente em tudo que faz. Espero que um dia eu possa ser uma professora e pesquisadora igual a você.

Agradecimento Fundamental

Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança depositada desde a iniciação científica. Sem a sua ajuda, esse trabalho também não teria sido realizado.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao meu namorado Guilherme, pela sua companhia todos estes anos. Você é uma pessoa maravilhosa, e sem dívidas, foi essencial para a realização desta conquista, sendo que sempre estive ao meu lado em todos os momentos em que mais precisei. Muito obrigada pelo carinho, paciência, amizade, compreensão e pelo seu amor!

Agradeço as minhas amigas: Andressa, Angelica, Fernanda, Iliana, Mayara, Pâmela e Priscila. Agradeço todos os dias por ter vocês como amigas. Vocês são pessoas incríveis!! Muito obrigada por todos os momentos de descontração, seja dentro ou fora do laboratório. Por me ajudarem na realização deste trabalho, pelas palavras de carinho e conselhos. Amo muito vocês!!

Aos meus colegas de laboratório: Ariane, Camilla, Lara e Matheus. Obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar.

As minhas amigos Ana Letícia, Isabela, Melina, Déborah e Eduardo. Muito obrigada pela amizade desde nossos tempos da graduação!! Sei que posso contar sempre com vocês.

Aos alunos da professora Neide: Estér, Layane, Rômulo, Loyane, Mário, Marcos Paulo e Natália. Muito obrigada pela disponibilidade em me ajudar, seja na confecção de lâminas ou auxílio com parasitos.

Agradeço aos funcionários da Histologia: Juscélia e Fabrício pelo apoio e disponibilidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e características gerais	12
1.3. Toxoplasmose	17
1.5. Tratamentos clássicos e alternativos para toxoplasmose	24
1.7. Placenta	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Cultura de células BeWo	33
4.2. Amostras de placenta humana e cultura de explantes de vilos coriônicos	33
4.3. Manutenção de taquizoítas de <i>T. gondii</i> : cepas virulentas (clone 2F1) e virulência intermediária (ME-49)	34
4.4. Tratamentos de células BeWo e de explantes de vilos coriônicos humanos com drogas: ensaio de viabilidade celular	34
4.5. Tratamentos de células BeWo com drogas: ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> com cepa altamente virulenta RH-clone 2F1	36
4.6. Tratamentos de células BeWo com drogas: ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> com cepa moderadamente virulenta ME-49	37
4.7. Tratamentos de explantes de vilos coriônicos humanos com drogas: ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> com cepa altamente virulenta RH-clone 2F1	38
4.8. Análise morfológica e imuno-histoquímica para detecção de parasitos	39
4.9. Dosagem de citocinas por ELISA	39
4.10. Análise estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Enrofloxacin e toltrazuril alteram a viabilidade celular apenas nas maiores concentrações	41
5.2. Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> (cepa RH-clone 2F1) em células BeWo	42
5.3. Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> (cepa ME-49) em células BeWo	43
5.4. Enrofloxacin induz produção de IL-6 e toltrazuril a secreção de MIF em células BeWo infectadas pela cepa RH (clone 2F1)	44

5.5. Enrofloxacin e toltrazuril regulam positivamente a produção de IL-6 e MIF em células BeWo infectadas com <i>T. gondii</i> (cepa ME-49).....	45
5.6. Toltrazuril não � tóxico para os explantes de vilos placentários humanos, mas enrofloxacin altera levemente a viabilidade do tecido na maior concentração	46
5.8. Enrofloxacin induz liberação de MIF em explantes de vilos placentários humanos	47
FIGURAS	54
ANEXOS	76

RESUMO

O tratamento clássico para a toxoplasmose congênita é baseado na combinação de sulfadiazina e pirimetamina mais ácido folínico. Devido aos efeitos teratogênicos e a supressão da medula óssea causados pela pirimetamina, o estabelecimento de novos alvos terapêuticos é indispensável para minimizar os efeitos indesejáveis e melhorar o controle da infecção por *T. gondii*. Estudos prévios demonstraram que enrofloxacin e toltrazuril são capazes de controlar o parasitismo em infecções por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de enrofloxacin e toltrazuril no controle da proliferação de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e em explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre. Células BeWo e vilos foram tratados com diferentes concentrações de enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação (sulfadiazina + pirimetamina) com o objetivo de avaliar a viabilidade pelo ensaio de MTT ou LDH, respectivamente. Em seguida, células BeWo foram infectadas com as cepas RH (clone 2F1) ou ME-49 de *T. gondii*, enquanto que os vilos foram infectados somente com a cepa RH. Em seguida, células e vilos foram tratados ou não com os mesmos medicamentos e a proliferação intracelular do parasito foi analisada pelo ensaio da β -galactosidase (para a cepa RH) ou coloração com azul de toluidina (para a cepa ME-49) e o perfil de citocinas foi analisado. Enrofloxacin e toltrazuril não alteraram a viabilidade nas células BeWo e nos vilos quando administrados nas menores concentrações. Além do mais, as drogas diminuíram a proliferação intracelular de *T. gondii* independentemente da cepa utilizada em células BeWo e em explantes de vilos quando comparado as condições infectadas e não tratadas. Em células BeWo infectadas por RH, enrofloxacin induziu altos níveis de IL-6 e não modificou significativamente a produção de MIF, enquanto que ambas as citocinas IL-6 e MIF foram produzidas por células BeWo infectadas com a cepa ME-49 e tratadas com enrofloxacin e toltrazuril. Adicionalmente, em vilos placentários, enrofloxacin induziu alta produção de MIF. Assim, podemos concluir que enrofloxacin e toltrazuril foram capazes de controlar o parasitismo em células BeWo e em explantes de vilos placentários humanos. Provavelmente este controle do parasitismo mediado por estas drogas ocorra por modulação da resposta imune nas células BeWo e tecidos placentários, mas não exclui a possibilidade de ação direta no parasito, entretanto futuros experimentos devem ser conduzidos para verificar esta hipótese.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose congênita, enrofloxacin, toltrazuril, tratamento.

ABSTRACT

The classical treatment for congenital toxoplasmosis is based on combination of sulfadiazine and pyrimethamine plus folinic acid. Due to teratogenic effects and bone marrow suppression caused by pyrimethamine, the establishment of new therapeutic targets is indispensable to minimize the undesirable effects and improve the control of the infection. Previous studies demonstrated that enrofloxacin and toltrazuril were able to control the infection triggered by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Therefore, the aim of this present study was evaluate the efficacy of enrofloxacin and toltrazuril in the control of *T. gondii* proliferation in human trophoblast cells (BeWo lineage) and in human villous explants from third trimester. BeWo cells and villous were treated with several concentrations of enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazine, pyrimethamine or association (sulfadiazine + pyrimethamine) in order to verify their viability by MTT or LDH assay, respectively. Next, BeWo cells were infected with *T. gondii* RH (2F1 clone) or ME49 strain, whereas villous were infected only with RH strain (2F1 clone), after, both cells and villous were treated or not with the same antibiotics and analyzed to *T. gondii* intracellular proliferation by beta-galactosidase assay (for RH strain) or blue toluidine staining (for ME49 strain). ELISA was performed in the supernatant to evaluate the cytokine profile. Enrofloxacin and toltrazuril did not change strongly the viability in cells and villous. Furthermore, the drugs decreased the parasite intracellular proliferation regardless *T. gondii* strain in BeWo cells and villous explants when compared to untreated and infected conditions. In BeWo cells infected by RH, enrofloxacin induced high levels of IL-6 low levels of MIF, while both cytokines were upregulated by enrofloxacin and toltrazuril in BeWo cells infected by ME49 strain. Additionally, in villous explantes, enrofloxacin induced high MIF production. Thus, enrofloxacin and toltrazuril were able to control the parasitism in BeWo cells and villous explants, and probably it occurs by modulation of immune response in these cells or tissues and direct action on parasite, but future experiments are necessary to verify this hypothesis.

Key words: *Toxoplasma gondii*, congenital toxoplasmosis, enrofloxacin, toltrazuril, treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii* e características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e responsável pela toxoplasmose (BUXTON et al., 2007; DUBEY, 2010). Esta infecção é amplamente difundida nos animais vertebrados, como aves e mamíferos, incluindo os seres humanos. Estima-se que um terço da população humana é acometida por esta infecção, e por esta razão, este é considerado um dos mais bem adaptados parasitos capaz de infectar os seres humanos (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; DUBEY, 2010; KUL et al., 2013). Estudos recentes indicaram que a sorologia positiva para *T. gondii* é aproximadamente quatro vezes maior no Brasil quando comparada aos Estados Unidos (DUBEY et al., 2012; FOROUTAN-RAD et al., 2016), e que a soroprevalência em gestantes no Brasil varia em torno de 36 a 92%, sendo considerado uma das maiores em relação à média global (FOROUTAN-RAD et al., 2016). A prevalência da infecção varia entre diferentes países, dentro de um mesmo país e também no interior de uma mesma região. E vários fatores são responsáveis pela alta prevalência de *T. gondii* no Brasil, incluindo hábitos alimentares dos humanos, as condições socioeconômicas, a qualidade do saneamento básico, bem como os próprios hábitos culturais são fatores importantes que propiciam tais diferenças (PAPPAS et al., 2009; ROBERT-GANGNEUX, 2014; FOROUTAN-RAD et al., 2016).

Morfológicamente, *T. gondii* se assemelha às demais células eucariontes, possuindo núcleo, retículo endoplasmático, Complexo de Golgi e mitocôndrias. No entanto, além de organelas típicas de organismos eucariontes, o protozoário apresenta ainda organelas localizadas na porção apical, envolvidas com os processos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira, incluindo as micronemas, roptrias e grânulos densos que estão também distribuídos ao longo da estrutura do parasito, e apicoplasto (BLADER; SAEIJ, 2009; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016).

As micronemas são responsáveis pela adesão do parasito à célula hospedeira, e durante a motilidade do parasito e a invasão na célula hospedeira, é gerada uma cascata de sinais que desencadeiam a secreção de adesinas, também conhecidas como micronemas, resultando no desenvolvimento de proteínas micronemais transmembrânicas na superfície do parasito, onde irá formar sítios de ligação com as células hospedeiras (SOLDATI-FAVRE, 2008; SOUZA et al., 2010; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016). Atualmente se conhece 20 tipos de proteínas secretadas pelas micronemas (ZHOU et al., 2005; BLADER; SAEIJ, 2009), sendo a proteína de

micronema tipo 2 (MIC2) a mais bem caracterizada. Tal proteína é expressa em todos os estágios invasivos do parasito e consegue se ligar 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). MIC1 pode mediar o reconhecimento dos glicanos da célula hospedeira via domínio de repetição adesinas de micronemas (MAR), os quais se ligam em domínios de micronemas tipo 3 (MIC3), facilitando a adesão na célula hospedeira (CÉREDE et al., 2005; HARKER et al., 2015). Além do mais, estudos demonstraram que antígenos de superfície 3 (SAG3) também se ligam a proteoglicanos da célula hospedeira, como heparina, facilitando o processo de adesão e invasão e dessa maneira é possível observar que a adesão, motilidade e invasão do taquizoítas são mediados por uma complexa rede de adesinas que agem em conjunto (HARKER et al., 2015). Durante a divisão celular e formação de novas células filhas, as micronemas são formadas através da síntese de novo e através da reciclagem das proteínas de micronemas secretadas pela célula mãe em uma rota endocítica (JIMENEZ-RUIZ et al., 2016).

Roptrias estão associadas à invasão na célula hospedeira e à síntese do vacúolo parasitóforo (SOUZA et al., 2010). A liberação de proteínas derivadas de roptrias (ROPs), onde várias subunidades de ROP-2, ROP-4, ROP-5 e ROP-8 associam-se para formar um complexo capaz de transportar o parasito para o interior da célula hospedeira (SOUZA et al., 2010).

Os grânulos densos descarregam seu conteúdo proteico no interior do vacúolo parasitóforo, os quais resistem a acidificação endossomal e a fusão com lisossomos, e estes parasitos exibem uma rápida multiplicação intracelular, redistribuem o citoesqueleto e organelas intracelulares do hospedeiro, e modulam a expressão de genes da célula. Dentro dos vacúolos parasitóforos *T. gondii* compete com a célula hospedeira pelos metabólitos, incluindo glicose, lipídeos e amino ácidos, assim como nucleotídeos para a sua sobrevivência (NAM, 2009; SOUZA et al., 2010; ZHOU et al., 2013).

O apicoplasto é uma organela semelhante a um plastídeo, derivado de algas vermelhas através de uma segunda endossimbiose. Embora a sua função fotossintética tenha sido perdida durante a evolução, esta organela ainda apresenta vias metabólicas de origem procarionte, das quais são essenciais para a sobrevivência do parasito (MARTINS-DUARTE et al., 2015; ARISUE; HASHIMOTO, 2015).

Além de apresentarem as estruturas apicais que são características do filo Apicomplexa, *T. gondii* ainda apresenta uma membrana dupla denominada de complexo de membrana interna localizado abaixo da membrana plasmática (HARDING; MEISSNER, 2014). O complexo de

membrana interna é composto por sacos achatados de membrana, presos a face citoplasmática por proteínas semelhantes a filamentos intermediários altamente organizadas e por interações com microtúbulos (HARING; MEISSNER, 2014). Além do mais, este complexo de membranas está presente tanto em taquizoítas, quanto em bradizoítas. Durante a divisão dos taquizoítas por endodiogenia, este complexo faz-se extremamente importante, uma vez que proteínas presentes neste compartimento regulam a formação de duas novas células dentro da célula mãe (FUNG et al., 2012; HARING; MEISSNER, 2014). Outro importante papel do complexo de membrana interna é atuar como ancoragem para o complexo motor da actina e miosina durante a motilidade e invasão na célula hospedeira (OPITZ; SOLDATI, 2002; BARGIERI et al., 2013; HARING; MEISSNER, 2014)

Toxoplasma gondii possui três estágios infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas são encontrados na fase aguda da infecção, caracterizando-se por apresentar alta capacidade de multiplicação e disseminação em vários tecidos, como os tecidos muscular, ocular, nervoso e placenta de hospedeiros (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010). Dentro das células hospedeiras, os taquizoítas situam-se no interior de vacúolos parasitóforos e a rápida multiplicação envolve vias de sinalização dependentes de fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase (PI3K/Akt). A maioria dos taquizoítas multiplica duas vezes para gerar quatro novos indivíduos após 24 horas de infecção (ZHOU et al., 2013). A inibição da via PI3K/Akt diminuiu significativamente a taxa de replicação de *T. gondii* nos vacúolos parasitóforos (ZHOU et al., 2013).

Os bradizoítas representam a forma lenta de multiplicação do parasito dentro da célula hospedeira, levando à formação de cistos teciduais, que podem abrigar de centenas a milhares de parasitos. Os cistos podem ficar alojados em vários tecidos do organismo por anos, como músculos, retina e cérebro. No interior dos cistos, os bradizoítas dividem por endodiogenia, caracterizada pela formação de duas células filhas no interior da célula mãe. Esta forma apresenta maior resistência as enzimas proteolíticas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Os esporozoítas estão localizados no interior de oocistos e são formados no trato intestinal de hospedeiros definitivos, representados por felinos selvagens e domésticos, e são liberados para o meio ambiente juntamente às fezes destes animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010; YAN et al., 2016). Os oocistos liberados não são esporulados e não conferem a capacidade de infectar hospedeiros; a esporulação e consequente capacidade de se tornarem infectantes depende de fatores ambientais, como humidade, calor e clima (YAN et al., 2016). Durante a esporulação, o núcleo do oocisto divide-se duas vezes,

formando quatro núcleos que migram para a região cortical, ocorre uma divisão citoplasmática separando cada dois núcleos e formando dois esporoblastos. O consequente alongamento destes esporoblastos bem como o espessamento da parede que os separam formam dois esporocistos, e em seguida ocorre a divisão dos núcleos, formando quatro esporozoários dentro de cada esporocisto (DUBEY et al., 1998).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxênico, tendo como hospedeiros definitivos os gêneros *Felix* e *Lynx*, e hospedeiros intermediários, aves e mamíferos incluindo o homem (DUBEY, 2010; YAN et al., 2016). Quando os felinos ingerem oocistos infectantes ou cistos teciduais, esporozoítos, bradizoítas ou taquizoítas são liberados na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, e penetram nos enterócitos dos felinos e por esquizogonia se transformam intracelularmente em esquizontes multinucleados após 3 a 7 dias de infecção. As subsequentes esquizogonias ocorrem dentro das células epiteliais no intestino dos felídeos. O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos, que por sua vez, dão origem aos microgametas (masculinos) e macrogametas (feminino) após diversas gerações (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; YAN et al., 2016). Um zigoto diploide que irá se desenvolver dentro dos oocistos após a fertilização do gameta feminino pelo gameta masculino. Oocistos não esporulados caem na luz intestinal e são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais em grande número, que por sua vez esporulam no meio ambiente sob condições favoráveis (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; YAN et al., 2016).

O desenvolvimento assexuado começa no intestino dos hospedeiros intermediários quando oocistos no meio ambiente, ou cistos teciduais são ingeridos por uma vasta gama de animais, incluindo o homem. Inicialmente, esporozoítas ou bradizoítas são liberados a partir de oocistos ou cistos, respectivamente; penetram nos enterócitos e rapidamente se desenvolvem em taquizoítas, os quais multiplicam rapidamente nas células nucleadas. Este parasito pode ser disseminado pelo corpo através dos leucócitos no sangue, e uma vez estabelecida a infecção, ocorre a formação de cistos teciduais, levando ao estágio crônico do ciclo assexuado (YAN et al., 2016). Um dos fatores que torna *T. gondii* um dos parasitos mais bem-sucedidos é poder desenvolver-se assexuadamente, permitindo a transmissão entre os hospedeiros intermediários de sangue quente através da predação e transmissão vertical sem o envolvimento de um hospedeiro definitivo (SU et al., 2003; YAN et al., 2016)

Os humanos podem ser infectados de diversas formas, por exemplo, pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos, ingestão de carne malcozida de bovinos e caprinos

contendo cistos teciduais, transplante de órgãos, transfusão de sangue, contato direto com os parasitos em acidentes laboratoriais ou através de transmissão vertical (COOK et al., 2000; GALVÁN-RAMIREZ et al., 2013; ROBERT-GANGNEUX, 2014; FOROUTAN-RAD et al., 2016).

1.2. Cepas de *T. gondii*

Dentro da estrutura populacional de *T. gondii*, há três linhagens clonais designadas como cepas do tipo I, II e III, que diferem geneticamente de 1% ou menos, as quais, são principalmente encontradas na Europa, América do Norte e Ásia (SHWAB et al., 2014; SHWAB et al., 2016). De acordo com o que é observado em laboratório, a cepa do tipo I, por exemplo a cepa RH, apresenta maior virulência e letalidade em camundongos com $DL_{100}=1$, causando graves manifestações clínicas, enquanto que a DL_{50} das cepas do tipo II e III são $\sim 10^3$ e 10^5 representando virulência moderada e fraca, respectivamente, e são capazes de induzir cronificação da infecção (YAROVINSKY, 2008). Análises feitas em amostras coletadas mundialmente identificaram 189 distintos genótipos (SHWAB et al., 2014) e a grande diversidade genética foi encontrada na América do Sul e América Central. Adicionalmente, na América do Sul as cepas apresentam-se mais virulentas em camundongos e em humanos do que as identificadas em outros continentes (SHWAB et al., 2014; SHWAB et al., 2016).

Parte da variabilidade da evolução da doença nas infecções em humanos está relacionado com o tipo de cepa responsável pela infecção. Na América do Norte e Europa, a maioria dos casos são devido a cepa do tipo II. A cepa do tipo III é mais comum em animais, e em geral não estão associadas a doenças, enquanto que a cepa do tipo I tem sido observada em graves infecções congênitas e em pacientes com AIDS (BOOTHROYD et al., 2002; MELO et al., 2011). Adicionalmente, na América do Sul, o parasito pode causar doenças, especialmente problemas oculares (BOOTHROYD et al., 2002; MELO et al., 2011). Existe alguma evidência de que estes problemas estão associados com cepas específicas. Dessa maneira, as cepas de *T. gondii* parecem causar diferentes patologias tanto em camundongos quanto em humanos (MELO et al., 2011).

Recentes trabalhos têm mostrado que fatores intrínsecos ao parasito determinam a virulência atribuída a cada cepa e conseqüentemente o modo como interagem com as células do hospedeiro desencadeando determinadas patologias. Os fatores mais bem descritos são as polimorfias encontradas nas roptrias, incluindo ROP18, ROP5, ROP16 e ROP17 (MELO et al., 2011).

ROP18 e ROP5 são determinantes na virulência em camundongos entre as linhagens de parasitos (SAEIJ et al., 2006; SHWAB et al., 2014). ROP18 é caracterizada como um dos principais fatores que contribuem para a diferenças de virulência cepa-específicas. Ela é secretada nas células hospedeiras permanecendo na superfície da membrana do vacúolo parasitóforo. É uma proteína polimórfica e os níveis de expressão variam de alto em cepas do tipo I e II para baixo em cepas do tipo III. ROP16 é importante em modular a resposta durante a invasão do parasito (ONG et al., 2010). Mais recentemente, ROP17 foi descrito por interagir com ROP5 e juntos desempenham o papel de evadir do sistema imune (SHWAB et al., 2016). ROP5 difere entre as cepas, e sua presença em cepas do tipo I conferem grande virulência (HUNTER; SIBLEY, 2013.)

Infecções com a cepa do tipo II desencadeiam uma resposta imune com o perfil Th1, a qual é suficiente para controlar o parasitismo. Após um determinado momento, um balanço entre a resposta pró e anti-inflamatória é alcançado e a infecção passa a ser, na maioria dos casos, assintomática. Por outro lado, a infecção com cepas do tipo I ou recombinantes aumentam a resposta do tipo Th2 a qual permite que o parasito se multiplique e se dissemine. Neste caso, como a infecção desencadeia uma resposta com perfil Th2, não há um balanço entre as respostas pró e anti-inflamatórias, e como consequência, a infecção ocorre de maneira sintomática e mais grave tanto em pacientes com ou sem susceptibilidade genética (XIAO; YOLKEN, 2015).

1.3. Toxoplasmose

No início da infecção, pode ser observado febre, mal-estar e linfadenopatia, ou a doença pode ocorrer, geralmente, de modo assintomático ou subclínico na maioria dos indivíduos imunocompetentes. Quando a infecção crônica é estabelecida, e o indivíduo é imunocomprometido, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou que fazem uso de medicamentos imunossupressivos em tratamentos para câncer ou após transplantes de órgãos, pode ocorrer a reativação dos bradizoítas presentes nos cistos teciduais que retornam ao estágio de taquizoítas e provocam graves problemas, como encefalite e lesões oculares (AMBROISE-THOMAS, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; JONES et al., 2014).

A toxoplasmose congênita pode ocorrer quando a mulher adquire a infecção por *T. gondii* durante a gestação próximo a concepção (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016). Recentemente, FRANCO e colaboradores (2015) observaram que pode haver infecção fetal quando fêmeas gestantes de *C. callosus* são

previamente infectadas com uma cepa de *T. gondii* e reinfetadas durante a gestação com diferentes genótipos do parasito, principalmente quando a reinfecção ocorre com cepas não clonais. A toxoplasmose congênita é considerada uma das formas mais graves da doença, e ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação, alcançando assim a circulação e os tecidos fetais (KODJIKIAN, 2010; VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016).

A transmissão congênita do parasito não é obrigatória, e os principais fatores que influenciam a probabilidade de infecção embrionária/fetal e a gravidade dos problemas nos recém-nascidos é o período gestacional em que a infecção materna ocorre, presença de tratamento ou não das gestantes e o tipo de cepa envolvida na infecção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KODJIKINA, 2010; VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016;). O risco geral de infecção fetal em mulheres que foram tratadas durante a gestação é em torno de 13%, mas essa taxa pode variar dependendo do período em que houve a infecção materna (LI et al., 2014). A probabilidade de haver infecção fetal quando a primo-infecção materna ocorre no período pré-concepção é de 1%; entretanto se a gestante adquire a infecção no primeiro ou segundo trimestre gestacional, a possibilidade da transmissão vertical está entre 10-20%, porém o comprometimento fetal é mais grave podendo ocasionar o aborto. Caso a infecção ocorra no terceiro trimestre, a possibilidade da infecção fetal situa-se entre 60-90%, mas o comprometimento fetal é menor (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KODJIKIAN, 2010). Estudos demonstram que infecções com as cepas de virulência intermediária (tipo II), embora a taxa de transmissão seja alta, a gravidade do acometimento fetal depende principalmente do período gestacional em que houve a infecção, já infecções com a cepa do tipo I são frequentemente associadas a sintomas graves da doença, independente do período em que ocorreu a infecção (VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016). Por outro lado, infecções com a cepa do tipo III levaram a infecções assintomáticas, uma vez que há a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente indução da formação de cistos. Adicionalmente, infecções com cepas recombinantes resultaram em problemas congênitos tanto graves ou assintomáticos, independente do período gestacional em que ocorreu a infecção (RICO-TORRES; VARGAS-VILLAVICENCIO; CORREA, 2016).

Quando mulheres são infectadas com *T. gondii* no primeiro trimestre de gestação, o parasito pode ser transmitido para o feto, podendo provocar abortos espontâneos ou problemas oculares e neurológicos, como retinocoroidite, calcificação intracraniana, microcefalia, estrabismo, cegueira, epilepsias, retardos psicomotor e mental e hidrocefalia (FATOOHI et al., 2002; KIEFFER; WALLON, 2013; LI et al., 2014). No entanto, muitos recém-nascidos com

toxoplasmose congênita podem ser assintomáticos no nascimento e poderão desenvolver a doença mais tardiamente, ao longo da vida, mais comumente, problemas oculares e também sintomas neurológicos e deficiências no desenvolvimento (JONES et al., 2014).

Dentre as manifestações mais comuns desenvolvidas pela toxoplasmose congênita é a retinocoroidite toxoplásmica, e é a principal causa de uveites (PREVIATO et al., 2015). A prevalência é variável em diferentes países, e estimativas sugerem que a doença ocorra em torno de 0,3 a 1% na Europa e América do Norte dentro de 1 a 2 anos após contrair a doença (PREVIATO et al., 2015). No Brasil, alguns estudos mostram que a prevalência da doença é variável, mas muito alta em adolescentes e adultos em algumas regiões do país, a doença varia de 2% no Sudeste a 25% na região Sul (GARCIA et al., 1999; PORTELA et al., 2004; PREVIATO et al., 2015). Além do mais, o risco de desenvolver a doença em indivíduos que contraíram a infecção congênita é maior que 20% antes de alcançarem os 6 anos de idade, em alguns casos as primeiras lesões podem aparecer na adolescência (MAENZ et al., 2014; PREVIATO et al., 2015).

A toxoplasmose congênita é um problema de saúde pública em muitos países, incluindo o Brasil. Estima-se que, no Brasil, cerca de 2700 crianças nasçam infectadas por *T. gondii* anualmente, o que amplia as necessidades de medidas preventivas e terapêuticas que visem minimizar a infecção congênita no país (DUBEY et al., 2012; CARELLOS et al., 2014) e com isso reduzir os gastos públicos na saúde e reduzir significativamente os casos de abortos e problemas neurológicos ou oculares em crianças infectadas congenitamente.

1.4. Resposta imune a *T. gondii*

A resposta imunológica contra *T. gondii* é predominantemente uma resposta imune mediada por células. A ativação do sistema imune ocorre após o reconhecimento do parasito por receptores semelhantes a Toll (TLRs) dependentes de “myeloid differentiation primary response gene 88” (MyD88), ou por receptores semelhantes a NOD (NLRs) durante a fase aguda da infecção (HOU et al, 2011; GORFU, 2014). O principal ligante de TLR11 identificado no parasito é a proteína semelhante a profilina (TgPRF), e trabalhos recentes mostram que TLR12 apresenta similaridades com TLR11, compartilhando significativas homologias entre si, quando comparado com outros TLRs de mamíferos, e que ambos os receptores são capazes de reconhecer ligantes comuns, como por exemplo TgPRF. Macrófagos e células dendríticas deficientes na produção de TLR12 (TLR12^{-/-}) falharam ao responder ao estímulo com TgPRF (KOBLANSKY et al., 2013). TgPRF é uma proteína padrão de reconhecimento de patógenos

(PAMPs) reconhecida por TLR11 e TLR12 (KOBLANSKY et al., 2013). Animais *knockout* para TLR11 e infectados com *T. gondii* tiveram uma redução drástica da produção de interleucina-12 (IL-12), e consequentemente uma ineficiente resposta imune contra o parasito (KOBLANSKY et al., 2013). *Toxoplasma* também possui moléculas de ancoragem do tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) e glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) que são reconhecidos por TLR2 e TLR4 (PLATTNER et al., 2008; MELO et al., 2011). A Ativação de TLRs desencadeia as vias dependentes de MyD88, que culminam na rápida ativação do fator de transcrição de fator nuclear κ B (NF- κ B). No entanto, dependendo do tipo de cepa do parasito, a ativação de NF- κ B pode ocorrer diretamente, independentemente de MyD88 (MELO et al., 2011). Como resultado da ativação de NF- κ B, ocorre a transcrição de inúmeros genes e consequente síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), IL-12, interleucina-18 (IL-18), e indução da produção de óxido nítrico sintase (iNOS) e de alguns NLRs (MELO et al., 2011). Tanto os receptores de IL-1 β quanto de IL-18 ativam NF- κ B e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e desencadeiam a produção de mais citocinas pró-inflamatórias. A secreção de IL-1 β e IL-18 amplifica a produção de interferon- γ por células *natural killer* (NK) (MELO et al., 2011).

A família IL-1 são responsáveis pela ativação da família de receptores inatos citoplasmáticos NLRs, que reconhecem diferentes classes de PAMPs. Alguns membros da família dos NLR incluem NLRP1, NLRP3 e NLRC4 e estão envolvidos na ativação da caspase-1 mediante a formação de um complexo multimolecular chamado de inflamassomos (MELO et al., 2011). A caspase-1 proteoliticamente converte as proformas de IL-1 β , IL-18 e interleucina-33 (IL-33) em citocinas bioativas (ADACHI et al., 1998; MELO et al., 2011). Notavelmente, animais deficientes para IL-18 apresentaram menor morbidade e patologias intestinais após a infecção oral, indicando que IL-18 induzida pelo parasito contribui para a imunopatologia (VOSENKAMPER et al., 2004). Já IL-33 também aparece após a infecção por *T. gondii*, e sua produção é principalmente por fibroblastos e células endoteliais, e seu receptor também transduz sinais através da via dependente de MyD88, mas ao invés de produzir citocinas pró-inflamatórias, ocasiona a produção de um perfil de resposta Th2. Então, é claro a habilidade do parasito em iniciar ambas as vias, pró e anti-inflamatória, da resposta imune, através de IL-1 β e IL-18 ou IL-33 (MELO et al., 2011).

Alternativamente, IL-12 é produzida por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos que são recrutados para o sítio de infecção. IL-12, por sua vez, estimula a ativação de transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (STAT4) e resulta na diferenciação de célula T em células com o perfil Th1 e estimula a alta produção de IFN- γ pelas células NK e por linfócitos TCD4⁺,

o que garante o estabelecimento de uma imunidade celular do tipo 1 ou Th1 (GAZZINELLI et al., 1994; KOBLANSKY et al., 2013; KEMP et al., 2013). IFN- γ é a principal citocina responsável pela ativação de uma variedade de atividades microbidas em células hematopoéticas e não hematopoéticas que limitam a replicação do parasito (HUNTER; SIBLEY, 2013).

IFN- γ ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), culminando na expressão de genes efetores como p47 GTPases, as quais auxiliam na destruição o parasito (KEMP et al., 2013), altera o metabolismo celular levando a produção de diversos mecanismos microbidas intracelulares como produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos, os quais podem proporcionar danos ao parasito e impede o seu crescimento dentro de macrófagos, promove o recrutamento de células TCD8⁺ pelo aumento da expressão de moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1), citotoxicidade de linfócitos TCD8⁺, o aumento da expressão de moléculas de histocompatibilidade classe II e indução da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) que induz a degradação do triptofano e como consequência, inibe o crescimento do parasito, permitindo o estabelecimento da infecção crônica, com a formação de cistos teciduais (GAZZINELLI et al., 1994; FUJIGAKI et al., 2002; SANECKA; FRICKEL, 2014; SA et al., 2013). IFN- γ é crucial para a manutenção da latência da infecção crônica e previne a reativação da infecção (SA et al., 2013).

Interleucina-2 (IL-2), uma citocina pro-inflamatória e inicialmente descrita como fator primário de crescimento de células T, tem diversas funções na regulação não apenas da proliferação, mas também no desenvolvimento de células T CD8⁺ após o estímulo com antígenos (SA et al., 2013) e é essencial para promover a resistência a infecção aguda por *T. gondii* e manutenção da latência durante a infecção crônica, uma vez que IL-2 mostrou ser importante para aumentar a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ durante a resposta secundária ao parasito. Interessantemente, IL-2 foi capaz de elevar os níveis de IFN- γ sem interferir na proliferação de células T. Adicionalmente, IL-2 mostrou facilitar a diferenciação de célula T CD8⁺ de memória em células efectoras para produzirem maiores níveis de IFN- γ e/ou ter atividade citotóxica na resposta contra *T. gondii* (SA et al., 2013).

Embora IFN- γ promova atividades antimicrobianas em inúmeros tipos celulares, em macrófagos, esta resposta não é suficiente para controlar o parasitismo, e um segundo sinal é requerido para o controle de *T. gondii*. O mais bem caracterizado segundo sinal que promove controle do parasito *in vitro* é a citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ou sinais desencadeados através de CD40, ambos utilizam a via de sinalização através de NF- κ B (ANDRADE et al., 2006; HUNTER; SIBLEY, 2013).

Além de IFN- γ , IL-12, IL-2 e TNF- α , *T. gondii* também induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-17A (IL-17A) (PASSOS et al., 2010) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) (FLORES et al., 2008). IL-17 parece ser importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (KELLY et al., 2005); enquanto que MIF demonstrou ser de extrema importância para o controle de *T. gondii* (FLORES et al., 2008).

Camundongos MIF *knockouts* (MIF^{-/-}) foram mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* quando infectados pelas cepas ME-49 ou RH em relação aos animais não geneticamente modificados (FLORES et al., 2008). A maior susceptibilidade dos animais MIF^{-/-} ao parasito foi consequência da reduzida produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-18 pelas células dendríticas destes animais (FLORES et al., 2008). Além disso, células dendríticas derivadas de camundongos MIF^{-/-} diminuíram significativamente sua maturação por expressarem baixos níveis de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40, prejudicando a resposta imune inata contra *T. gondii* (TERRAZAS et al., 2010). Estes dados sugerem que MIF age na regulação da função de células do sistema imune em animais infectados por *T. gondii* (FLORES et al., 2008; TERRAZAS et al., 2010), evidenciando o efeito protetor de MIF contra este parasito. De maneira semelhante, Cavalcanti e colaboradores (2011) observaram o importante papel de MIF no controle de *T. gondii* no intestino de camundongos infectados, uma vez que MIF induziu à produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e interleucina-23 (IL-23). De forma interessante, recentemente foi descrito que *T. gondii* sintetiza um homólogo de MIF, que foi denominado de TgMIF. TgMIF do parasito tem a habilidade de modular a resposta imune do hospedeiro, uma vez que ativa MAPK, especialmente ERK1/2, e induz a produção de IL-8 em células mononucleares de sangue periférico humano, importante mediador inflamatório com função de recrutar neutrófilos para o sítio de infecção (SOMMERVILLE et al., 2013). Finalmente, alguns trabalhos publicados nos últimos anos do nosso grupo de pesquisa mostraram o importante papel de MIF nos processos inflamatórios e no controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal, especialmente em células trofoblásticas humanas (FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2011; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

Outro mecanismo recentemente descrito que permite a latência do parasito é a presença de receptores semelhantes a Sort (TgSORTLR) e TgARO “*T. gondii* armadillo repeats only protein”, proteínas responsáveis por organizar as roptrias na porção apical do parasito, que medeiam o tráfico de organelas do complexo apical do parasito e a subsequente secreção de fatores de virulência. Animais que foram desafiados com parasitos *knockout* para as proteínas

TgSORTL e TgARO e que foram novamente desafiados com parasitos que não apresentaram a modificação para a expressão da proteína, falharam no desenvolvimento de uma resposta protetora, ocasionando na morte destes animais. Dessa maneira a ausência destas duas proteínas inibiu completamente desenvolvimento da imunidade adaptativa dependente de células T, IFN- γ e interleucina-10 (IL-10), e comprometeram a função da imunidade inata mediada por células NK. Estes resultados indicam que a secreção de antígenos pelas organelas apicais é essencial para promover uma resposta imune protetora contra *T. gondii* (SLOVES et al., 2015).

De maneira geral, os mecanismos efetores da resposta imune estão sob controle de fatores de transcrição que são regulados positivamente para combater microorganismos invasores. Por sua vez, patógenos tem desenvolvido estratégias para evadir da resposta imune do hospedeiro. A infecção por *T. gondii* induz inúmeras alterações na célula hospedeira, incluindo alteração na transcrição de genes envolvidos no metabolismo, na resposta imune e na sinalização (KEMP et al., 2013). Durante a resposta imune, a ativação de vias anti-inflamatórias é essencial para balancear a resposta pró-inflamatória e prevenir que ocorra danos ao hospedeiro. Uma vez estabelecida a infecção, a citocina IL-10 ativa transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3), e ao mesmo tempo, interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) induzem a ativação de STAT6 e ocorre uma modulação negativa da resposta Th1 pró-inflamatória (KEMP et al., 2013).

T. gondii normalmente consegue subverter a resposta imune do hospedeiro evadindo dos mecanismos de proteção das células. É sabido que a infecção pode ocasionar a inibição de algumas vias de sinalização envolvidas na imunidade protetora, bloqueando STAT1 e NF- κ B, tornando os parasitos resistentes a ação de IFN- γ . O parasito pode ainda regular positivamente vias de sinalização anti-inflamatórias, incluindo supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS1), supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) e STAT3, potencialmente comprometendo os mecanismos de controle das células hospedeira (HUNTER; SIBLEY, 2013).

Assim, a resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii* é muito importante para controlar o parasitismo, mas como não elimina definitivamente a infecção no hospedeiro e como o parasito subverte a resposta imune, faz-se necessário o uso de medicamentos nos indivíduos imunocompetentes sintomáticos, imunocomprometidos, gestantes infectadas antes ou durante a gestação e em recém-nascidos ou crianças infectadas congenitamente (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004).

1.5. Tratamentos clássicos e alternativos para toxoplasmose

O tratamento clássico para a toxoplasmose se baseia no uso de sulfadiazina e pirimetamina, ambas apresentam um efeito sinérgico na diminuição da replicação de *T. gondii* por meio da inibição sequencial de enzimas como dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR). Estas enzimas são responsáveis pela síntese de compostos de folato que são essenciais para a sobrevivência e replicação do parasito (VILLENNA et al., 1998; DOLIWA et al., 2013a). É necessária a coadministração de ácido fólico para minimizar os efeitos tóxicos da pirimetamina.

A administração de pirimetamina não é recomendada durante o primeiro trimestre de gestação por ter efeito teratogênico e ainda pode prejudicar a atividade da medula óssea (MONTROYA; REMINGTON, 2008; OZ, 2014a). Normalmente, pacientes não são tolerantes a sulfadiazina e quando administrada por um longo período, é associada a problemas gastrointestinais o que leva a descontinuidade do tratamento (MARTINS-DUARTE et al., 2015). Durante o primeiro trimestre de gestação, e quando não há evidências de infecção fetal, o tratamento durante a fase aguda da infecção é realizado com espiramicina para reduzir o risco de transmissão de *T. gondii* através da placenta (ELSHEIKHA, 2008; JULLIAC et al., 2010; OZ, 2014a). Essa droga é um macrolídeo por isso não oferece risco ao feto, uma vez que não atravessa a barreira placentária (OZ, 2014a). Rodrigues e colaboradores (2014) avaliaram a ação de espiramicina indicando que este medicamento reduz a frequência das manifestações clínicas em recém-nascidos, minimizando a gravidade da infecção congênita. Além do mais, pacientes tratados com espiramicina mantiveram o DNA de *Toxoplasma* no sangue periférico, permanecendo infectadas (HABIB, 2008). Caso a gestante se infecte depois de 18 semanas ou se a infecção do feto for confirmada, é necessário a utilização de associação sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico (MONTROYA; LIENSEFELD, 2004; MONTROYA; REMINGTON, 2008; DOLIWA et al., 2013b).

Embora o tratamento com sulfadiazina, pirimetamina e espiramicina seja o mais utilizado pela medicina tradicional, essas drogas são consideradas tóxicas e podem ocasionar efeitos colaterais tanto para a gestante quanto para o feto. Além disso, esta clássica combinação de drogas não é capaz de eliminar completamente a infecção, desse modo, apenas reduz as taxas de transmissão vertical. Desta forma, é importante o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas que possam reduzir a transmissão vertical de *T. gondii* e que, ao mesmo tempo, minimizem os efeitos colaterais indesejados.

Inúmeras drogas alternativas têm demonstrado efeito protetor contra infecção por *T. gondii*. Azasterol, um inibidor da biossíntese de esteróis, mostrou capacidade para inibir a

proliferação de *T. gondii* em células LLC-MK₂ (células renais de macaco) por ter ação contra as mitocôndrias do parasito e por induzir diferenciação de taquizoítas em bradizoítas. (DANTAS-LEITE et al., 2004). Adicionalmente, estudos anteriores demonstraram que a infusão de *Artemisia annua* reduziu significativamente a mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas ME-49 ou RH de *T. gondii* (OLIVEIRA et al., 2009), bem como a transmissão vertical de *T. gondii* em roedores *Calomys callosus* (COSTA et al., 2009). Além disso, azitromicina também foi capaz de diminuir a transmissão vertical de *T. gondii* em *C. callosus* (COSTA et al., 2009) e os efeitos oculares da infecção congênita de fetos deste roedor (LOPES et al., 2009). Azitromicina também apresentou habilidade para reduzir significativamente a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células trofoblásticas humanas da linhagem BeWo (FRANCO et al., 2011), além de controlar o parasitismo em explantes de vilos placentários humanos (CASTRO-FELICE et al., 2014). Outro medicamento que tem mostrado excelentes resultados no controle do parasitismo desencadeado por *T. gondii* é diclazuril. Este medicamento reduziu a patogênese na infecção materna e fetal durante a gestação e demonstrou ser seguro e efetivo para as fêmeas gestantes e seus respectivos fetos (OZ; TOBIN, 2014). Adicionalmente, a combinação de diclazuril e atovacona demonstrou ser uma boa estratégia para controlar os sintomas da toxoplasmose congênita. Tanto fêmeas gestantes quanto os fetos não tratados apresentaram redução do peso, ascite, esplenomegalia, hepatomegalia e hepatite grave, e o número de recém-nascidos foi menor. Contrariamente, animais tratados tiveram as patologias normalizadas, e o número de fetos semelhantes ao controle não infectado (OZ, 2014b). Enrofloxacin, um antibiótico da classe das fluoroquinolonas, demonstrou significativo efeito protetor contra *T. gondii* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (BARBOSA et al., 2012). E, finalmente, toltrazuril é um medicamento que tem apresentado excelentes resultados contra alguns estágios infectantes de alguns membros do filo Apicomplexa, incluindo *T. gondii*, em ensaios feitos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KUL et al., 2013).

1.6. Enrofloxacin e toltrazuril

Enrofloxacin é um antibiótico da classe das fluoroquinolonas de amplo espectro antibacteriano e é indicado para o tratamento de infecções respiratórias e do trato gastrointestinal, sendo recomendado contra Enterobacteriaceae, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pastuerella multocida*, bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e algumas bactérias gram-positivas (DEVREESE

et al., 2014). Fluoroquinolonas foram descobertas na década de 60, como um derivado de cloroquina, um medicamento antimalárico (PALLO-ZIMMERMAN et al, 2010). O mecanismo de ação farmacocinética desta classe de antibióticos consiste na inibição da atividade da DNA girase (conhecida como topoisomerase II), uma das enzimas topoisomerases mais importantes encontradas em todas as bactérias e que são responsáveis pela replicação do DNA, prevenindo a formação das forquilhas de replicação e, conseqüentemente, a transcrição e duplicação (WILLMOTT et al., 1994; PALLO-ZIMMERMAN et al, 2010; MARTINS-DUARTE et al., 2015). Embora os mamíferos também dependam de topoisomerases para o reparo do DNA, as fluoroquinolonas possuem grande afinidade pela DNA girase bacteriana do que pela DNA girase dos mamíferos. E estas diferenças permitem que as fluoroquinolonas possuam uma rápida atividade bactericida sem provocar efeitos adversos aos hospedeiros. Além do mais as fluoroquinolonas possuem um segundo alvo, a topoisomerase IV, a qual está envolvida no relaxamento do DNA e na dissociação dos cromossomos após a replicação. A interrupção da ação desta enzima ocasiona na morte da bactéria (PALLO-ZIMMERMAN et al, 2010).

Enrofloxacin tem como principal metabólito ativo a ciprofloxacin (DEVREESE et al., 2014). Este medicamento apresenta amplo uso na medicina veterinária, mostrando ser efetivo contra *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* em casos de pioderma em cães, enquanto que estas bactérias apresentaram resistência aos beta-lactâmicos (HARIHARAN et al., 2014), foi importante no controle do crescimento de *Mycobacteria* em cães e gatos (GOVENDIR et al., 2011) e no tratamento da endometriose em equinos (GONZÁLEZ et al., 2010). Em adição, enrofloxacin também reduziu significativamente a infecção pela bactéria *Bartonella henselae* em gatos e humanos (BISWAS et al., 2010) e a infecção causada por alguns patógenos em coelhos *Angora rabbits* (ELMAS et al., 2007). Enrofloxacin também demonstrou ser eficiente no controle de protozoários. Delespaux e colaboradores (2010) observaram a diminuição de 50% do parasitismo em camundongos infectados com *Trypanosoma congolense* em bovinos, além de controlar a criptosporidiose em aves (SRÉTER et al., 2002). A infecção por *Neospora caninum*, parasito do filo Apicomplexa e altamente semelhante a *T. gondii*, também foi reduzida em cérebros de fêmeas grávidas de camundongos da linhagem C57/BL6 após o tratamento com enrofloxacin (GOTTSTEIN et al., 2005).

Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que enrofloxacin foi mais eficiente em controlar a invasão e a replicação de *T. gondii* (cepa RH) em fibroblasto humano da linhagem HFF se comparado ao tratamento tradicional composto por sulfadiazina e pirimetamina (BARBOSA et al., 2012). Adicionalmente, enrofloxacin também diminuiu o número de parasitos totais e a imunopatologia em encéfalos de *C. callosus* (BARBOSA et al., 2012).

Toltrazuril, (1-(3-metil-4'-trifluorometil-tiofenoxe)-fenil)-3metil-1,3,5-triazina-2,4,6 (1H, 3H, 5H) triona, é um medicamento de uso veterinário amplamente utilizado para tratar, controlar e prevenir diversas coccidioses em aves, suínos, bovinos, ovelhas e cabras (DIRIKOLU et al., 2008; OLSEN et al., 2012). Os principais metabólitos de toltrazuril são toltrazuril sulfona (ponazuril) e toltrazuril sulfoxida e têm mostrado serem extremamente eficientes no controle da infecção por *T. gondii*, pois atuam nas diversas formas evolutivas do parasito, agindo sobre estágios sexuais ou assexuados do parasito no intestino de gatos (HABERKORN, 1996; KUL, 2013). Este medicamento tem demonstrado ser prejudicial para taquizoítas, por induzir dano mitocondrial e inibe a divisão celular do parasito no intestino dos hospedeiros definitivos (MITCHELL et al., 2004; KUL et al., 2013).

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que toltrazuril além de atuar nas formas evolutivas de *T. gondii*, tem sido efetivo para outros membros do filo Apicomplexa, incluindo *Eimeria* sp, *Isospora* sp e *N. caninum* (HABERKORN et al., 2001; KUL et al., 2013; PHILLIPE et al., 2014). Um estudo realizado com células de rim infectadas com *N. caninum* e tratadas com toltrazuril e ponazuril indicaram que estes medicamentos causaram uma redução significativa do número de taquizoítas intracelulares, e as análises em microscopia eletrônica demonstraram grandes danos ao parasito, uma vez que a divisão do mesmo foi inibida, houve alteração no DNA, levando a perturbações na divisão nuclear, além do mais, os tratamentos também levaram a rupturas na membrana dos vacúolos parasitóforos e finalmente, causaram destruição completa das mitocôndrias e do apicoplasto (DARIUS et al., 2004). Adicionalmente, Igbal e colaboradores (2013) avaliaram a eficácia de toltrazuril em filhotes de cabras frente à infecção por *Eimeria* sp, indicando ser mais uma vez um quimioterápico altamente eficiente, levando a uma redução completa de oocistos nas amostras fecais desses animais. Bosco e colaboradores (2015) realizaram um experimento com filhotes de búfalos infectados naturalmente com *Eimeria* spp. e após o tratamento com toltrazuril foi observado novamente que houve diminuição da excreção de oocistos nas fezes e houve ganho de peso corporal se comparado com animais não tratados. Um estudo realizado por Gottstein e colaboradores (2005) mostrou que toltrazuril tem sido uma boa estratégia de tratamento da neosporose congênita em camundongos, levando a uma redução significativa do número de reabsorções fetais em fêmeas grávidas. Em outro estudo, Strohbusch e colaboradores (2009), infectaram fêmeas de camundongos C57BL6 com *N. caninum* durante a gestação, e os recém-nascidos, infectados congenitamente, foram tratados com toltrazuril e apresentaram retardo das manifestações da neosporose, e houve maior sobrevivência destes animais se comparado aos recém-nascidos tratados com placebo.

Assim, considerando os efeitos benéficos de toltrazuril no controle de doenças causados por diversos membros do filo Apicomplexa e no controle da neosporose congênita, e ainda que enrofloxacin também mostrou potencial efeito protetor contra *T. gondii*, ambos medicamentos podem ser considerados estratégias alternativas de tratamento para a toxoplasmose, especialmente a forma congênita da infecção que representa um importante problema de saúde pública no Brasil.

1.7. Placenta

A placenta é um órgão altamente especializado da gestação que, junto com as membranas fetais e o líquido amniótico, suportam o crescimento e desenvolvimento do feto que interage com o endométrio e tem como função nutrir, permitindo o transporte de carboidratos, amino ácidos, lipídeos, água, sais inorgânicos, minerais e vitaminas; permitir trocas de gases entre mãe e feto, uma vez que esta estrutura é permeável ao oxigênio e dióxido de carbono; e é considerada uma barreira efetiva contra diversos agentes, além de orquestrar adaptações maternas para a gestação (GUDE et al., 2004; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012), incluindo a secreção de mais de 100 peptídeos e hormônios esteroides que modulam a fisiologia materna, como gonadotropina coriônica, hormônio de crescimento placentário ou lactogênio placentário, progesterona e insulina (GUDE et al., 2004; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012; VELICKY et al., 2015).

Placenta é um pré-requisito para a sobrevivência dos embriões de mamíferos. A estrutura deste órgão e a diversidade dos subtipos de trofoblasto diferem bastante entre os mamíferos, existindo quatro diferentes tipos de placentas: epiteliocorial, sinoepiteliocorial endoteliocorial e hemocorial. A placenta epiteliocorial é presente em suínos e equinos, sendo caracterizada pelo contato do cório ao epitélio endometrial intacto. A morfologia sinoepiteliocorial está presente em ruminantes, no qual o epitélio uterino é removido e o cório fica em contato direto ao tecido conjuntivo endometrial. Adicionalmente, a placenta endoteliocorial é presente em carnívoros, e a mucosa endometrial é removida e o cório alcança o endotélio materno. Já na maioria dos roedores e primatas, incluindo o homem, desenvolvem a placenta conhecida como hemocorial, estruturada como árvores vilosas e definida pelo contato direto entre o sangue materno e células trofoblásticas. Outra característica de placentas hemocorial é a grande capacidade de invasiva, alcançando profundamente a decídua (GUDES et al., 2004; VELICKY et al., 2015).

A estrutura da placenta humana é composta por uma porção materna (decídua) e outra fetal (placa coriônica). As células deciduais são derivadas de fibroblastos, que se diferenciam e formam a decídua, as quais secretam citocinas, incluindo IL-15, fatores de crescimento e agentes imunomoduladores envolvidos na regulação da invasão do trofoblasto (VERMA et al., 2000). A placa coriônica é formada pelos vilos coriônicos, que formam a própria barreira placentária, organizadas em inúmeras ramificações com o objetivo de aumentar a área de superfície com o sangue materno (GUDE et al., 2004).

Em humanos, a interface materno-fetal é compreendida pelo sinciciotrofoblasto, o qual está diretamente em contato com o sangue materno, citotrofoblasto, mesênquima, endotélio fetal e o trofoblasto extraviloso, o qual é responsável pela ancoragem da placenta no útero. Embora a placenta forme uma barreira contra a transmissão de diversos patógenos para o feto, muitos destes podem ser transmitidos por via transplacentária (GUDE et al., 2004, HARKER; UENO; LODOEN, 2015). Assim, estudos utilizando vilos placentários humanos são muito importantes para se estudar *in vitro* a interface materno-fetal e os mecanismos envolvidos neste microambiente após a infecção com parasitos, incluindo *T. gondii*. Estudos usando placenta humana como modelo experimental tem demonstrado que *T. gondii* infecta o sinciciotrofoblasto e a camada de células abaixo, o citotrofoblasto, que formam os vilos coriônicos (HARKER; UENO; LODOEN, 2015). A infecção do citotrofoblasto pode desempenhar um papel crítico na maior taxa de infecção fetal no terceiro trimestre gestacional. Além do mais, recentes trabalhos têm demonstrado que as cepas do tipo I, II e III de *T. gondii* infectam predominantemente a pequena camada composta por trofoblasto extraviloso preferencialmente do que a grande camada de sinciciotrofoblasto, sugerindo que estes parasitos podem alcançar a placenta por uma via vulnerável da interface (ROBBINS et al., 2012; HARKER et al., 2015). Além do mais, Gomes e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de MIF na infecção por *T. gondii* em explantes de vilos de primeiro e terceiro trimestre. Adicionalmente, vilos de placenta humana foram utilizados como modelo para avaliar efeitos de tratamentos alternativos para a toxoplasmose congênita (CASTRO-FELICE et al., 2014).

1.8. Células trofoblásticas humanas e a linhagem BeWo

Como anteriormente descrito, o trofoblasto é uma população celular importante da interface materno-fetal. O trofoblasto é uma célula de origem fetal que possui uma diversidade de funções que propiciam o sucesso gestacional. Primeiramente, esta célula é responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio receptivo, pela nutrição do embrião e por formar

a porção fetal da placenta (FITZGERALD et al., 2008). Além disso, estas células participam efetivamente do diálogo na interface materno-fetal pela produção de citocinas e mediadores químicos (CHARLLIS et al., 2009; BARBOSA et al., 2014).

Para melhor compreender o papel do trofoblasto na imunologia da gestação e, especialmente, na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando-se de linhagens celulares pré-estabelecidas, como as células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo), isoladas em 1968 e que mantém muitas características típicas de trofoblasto humano (PATTILLO; GEY, 1968). Nossos estudos prévios demonstraram que células BeWo foram altamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* na presença de IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- β 1 (BARBOSA et al., 2008). Adicionalmente, IFN- γ , citocina pró-inflamatória que deveria controlar a disseminação do parasito, foi incapaz de controlar ambas invasão e replicação de *T. gondii* em células BeWo (BARBOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006), embora o tratamento destas células com IFN- γ tenha controlado a replicação de *N. caninum*, parasito altamente semelhante a *T. gondii* (CARVALHO et al., 2010). Franco e colaboradores (2011) demonstraram que células BeWo tratadas com azitromicina reduziram a invasão e a proliferação intracelular de *T. gondii*. E, recentemente, nossos estudos prévios demonstraram que células BeWo foram excelentes modelos experimentais *in vitro* para o estudo de apoptose no trofoblasto humano (ANGELONI et al., 2013), bem como no estudo da interação do trofoblasto humano com monócitos humanos (CASTRO et al., 2013) e também no papel da prostaglandina E₂ (PGE₂) na susceptibilidade do trofoblasto humano mediante infecção por *T. gondii* (BARBOSA et al., 2014). Portanto, células BeWo mostram-se como excelentes modelos experimentais de trofoblasto humano para estudo da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é um grave problema de saúde pública brasileira. Estudos recentes mostram que, a cada 10.000 nascimentos, 5 a 23 crianças apresentam-se infectadas por *T. gondii*, podendo ocorrer problemas neurológicos, cegueira, retardamento mental, lesões oculares e até abortos (DUBEY et al., 2012). Portanto, faz-se necessário o estabelecimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que visem controlar a transmissão vertical de *T. gondii* e diminuir os danos causados ao feto, uma vez que os medicamentos convencionais ocasionam diversos efeitos colaterais, incluindo efeitos teratogênicos. De acordo com trabalhos prévios, foi observado que enrofloxacina reduz a infecção por *T. gondii* das cepas RH e ME-49 em fibroblastos humanos (linhagem HFF) e em roedores *C. callosus*, respectivamente (BARBOSA et al., 2012). Adicionalmente, toltrazuril também tem demonstrado ser eficiente no controle de estágios evolutivos de *T. gondii* e outros membros do filo Apicomplexa (HABERKORN et al., 2001; KUL, 2013).

Assim, levando em consideração que células BeWo são linhagens celulares usadas como modelos de estudo do trofoblasto humano (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015), que explantes de vilos de placenta humana também representam adequado modelo de estudo *in vitro* do trofoblasto e especificamente da interface materno-fetal (GOMES et al., 2011; CASTRO-FILICE, et al., 2014), e finalmente que ambas as drogas (enrofloxacina e toltrazuril) apresentam um significativo efeito protetor contra *T. gondii*, o presente estudo se justifica por buscar estabelecer estratégias alternativas de tratamento para prevenir ou reduzir as taxas de transmissão congênita deste parasito ao investigar o efeito destas drogas na susceptibilidade de células BeWo e explantes de vilos à infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficácia de enrofloxacin e toltrazuril no controle da infecção causada por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e em explantes de vilos placentários humanos a termo (terceiro trimestre gestacional).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de enrofloxacin e toltrazuril em comparação com sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina na citotoxicidade (viabilidade celular) de células trofoblásticas BeWo e na toxicidade de explantes de vilos placentários.
- Avaliar o efeito de enrofloxacin e toltrazuril em comparação com sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina na proliferação intracelular de *T. gondii* em células trofoblásticas BeWo infectadas por cepas de alta virulência (RH-2F1) ou de virulência moderada (ME-49) de *T. gondii*.
- Avaliar o efeito de enrofloxacin, toltrazuril em comparação com sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina na proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilos placentários infectados por cepa de alta virulência (RH-2F1) de *T. gondii*.
- Avaliar o efeito de enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células trofoblásticas BeWo e explantes de vilos placentários infectados por *T. gondii* (cepas RH-2F1 ou ME-49).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células BeWo

Células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e foram cultivadas em frascos de cultura de 75cm² (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), 100 U/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2015). Células BeWo foram utilizadas como modelo experimental de trofoblasto humano para todas as condições experimentais em que foram usadas, e também para a manutenção de *T. gondii* em cultura. De acordo com o Comunicado Nº13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU declara que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo I).

4.2. Amostras de placenta humana e cultura de explantes de vilos coriônicos

Placentas humanas a termo (n=4) foram adquiridas de pacientes gestantes após o parto cesariano (36 a 40 semanas de gestação). As placentas foram coletadas apenas de pacientes que não apresentaram pré-eclâmpsia, hipertensão coriônica, doenças infecciosas incluindo toxoplasmose, doenças cardíacas, diabetes e outras manifestações clínicas que pudessem interferir nos resultados. A coleta das placentas foi autorizada de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil (Nº 1.585.342) (Anexo II).

Após a coleta, a placenta foi lavada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril para a remoção do excesso de sangue, seguido da dissecação com o auxílio de um esteriomicroscópio para remover o tecido endometrial em até uma hora após a coleta. Vilos placentários terminais flutuantes foram coletados e posteriormente colocados em placas de 96 poços (um por poço) e cultivados em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de SBF (Cultilab), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma) durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, para posterior realização dos diferentes tratamentos. O volume dos vilos coletados foi de aproximadamente 10 mm³. Os vilos coriônicos humanos foram utilizados como modelo de interface materno-fetal humana, apresentando sinciciotrofoblasto externamente, citotrofoblasto e mesênquima no interior (GOMES et al., 2011; CASTRO-FILICE et al., 2014).

4.3. Manutenção de taquizoítas de *T. gondii*: cepas virulentas (clone 2F1) e virulência intermediária (ME-49)

Taquizoítas 2F1 de *T. gondii*, que são derivados da cepa de alta virulência (RH) e que expressam constitutivamente o gene da β -galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Vern Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Em paralelo, taquizoítas de *T. gondii* da cepa ME-49 foram cedidos pela Dra. Karine Resende de Oliveira da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, MG, Brasil. Ambas as cepas foram mantidas em frascos de cultura contendo células BeWo confluentes em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 μ g/mL) e 2% de SBF em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ (ANGELONI et al., 2013; BARBOSA et al., 2015).

4.4. Tratamentos de células BeWo e de explantes de vilos coriônicos humanos com drogas: ensaio de viabilidade celular

Inicialmente, com o intuito de verificar se os tratamentos com os diferentes antibióticos poderiam ser tóxicos para as células BeWo e para determinar a concentração ideal de cada droga para ser usada nos experimentos posteriores, o ensaio colorimétrico com sais de tetrazolium (MTT) foi realizado como previamente descrito por Mosmann (1983).

Para este propósito, células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço/200 μ L) por 24 horas em meio RPMI com 10% de FBS a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com sulfadiazina (Laboratório Catarinense S.A, Joinville, SC, Brasil), enrofloxacina (Bayer Healthcare, São Paulo, SP, Brasil) ou toltrazuril (Bayer Healthcare) nas seguintes concentrações crescentes em meio a 5% de SBF: 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ou 200 μ g/mL (BARBOSA et al., 2012). Paralelamente, células BeWo também foram tratadas com pirimetamina (Sigma) por 24 horas nas seguintes doses: 0,0624 μ g/mL; 0,125 μ g/mL; 0,250 μ g/mL; 0,500 μ g/mL; 1 μ g/mL; 2 μ g/mL; 4 μ g/mL ou 8 μ g/mL em meio a 5% de SBF. Finalmente, a associação de sulfadiazina e pirimetamina também foi usada no tratamento por 24 horas como segue: 1,56 μ g/mL + 0,0624 μ g/mL; 3,125 μ g/mL + 0,125 μ g/mL; 6,25 μ g/mL + 0,250 μ g/mL; 12,5 μ g/mL + 0,500 μ g/mL; 25 μ g/mL + 1 μ g/mL; 50 μ g/mL + 2 μ g/mL; 100 μ g/mL + 4 μ g/mL ou 200 μ g/mL + 8 μ g/mL, respectivamente, em meio a 5% de SBF. As diferentes concentrações de pirimetamina foram baseadas na proporção correspondente a 4% das doses selecionadas para sulfadiazina (DEROUIN; CHASTANG, 1989; MENECEUR et al., 2008; JIN et al., 2009). Enrofloxacina e toltrazuril foram diluídos

em meio RPMI a 10% de SBF. No entanto, sulfadiazina e pirimetamina foram diluídos em meio RPMI contendo dimetil sulfóxido (DMSO) com o objetivo de melhorar a diluição destas drogas. Para verificar se o DMSO poderia ser tóxico para as células BeWo, nós tratamos as células com 0,26% de DMSO em meio RPMI, a porcentagem usada nos tratamentos com pirimetamina, sulfadiazina ou associação. Sulfadiazina ou/e pirimetamina foram usados como controle positivo, enquanto que o controle negativo foi células BeWo tratadas apenas com meio RPMI a 5% de SBF.

Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram removidos das placas e foi adicionado em cada poço 10 µL de MTT (Sigma) em 90 µL de meio contendo 10% de SBF por 4 horas nas mesmas condições de cultura. O MTT é um reagente de cor amarela que é reduzido em cristais de formazan violetas apenas em células viáveis. Após as 4 horas em estufa, estes cristais foram solubilizados em solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) a 10% e N, N- dimetil formamida (Sigma) a 50% (MOSMANN, 1983). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a densidade óptica foi mensurada a 570 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram apresentados como porcentagem de células viáveis em comparação com células não tratadas (100% de viabilidade celular). Foram realizados três experimentos independentes em nonoplicata.

Em uma segunda etapa de experimentos, para avaliação da toxicidade das diferentes concentrações das diversas drogas em explantes de vilos placentários, estes foram incubados por 24 horas com meio a 10% de SBF a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram tratados com os medicamentos diluídos em meio a 10% de SBF e em diferentes concentrações. As concentrações usadas foram 700 ou 800 µg/mL para enrofloxacina; 500; 800 ou 900 µg/mL para toltrazuril; e 150 µg/mL + 200 µg/mL para associação de sulfadiazina e pirimetamina (controle positivo), respectivamente (CASTRO-FILICE et al., 2014). Como controle negativo, os explantes de vilos não receberam antibióticos e foram tratados apenas com meio de cultura a 10% de SBF (100% de viabilidade), enquanto que o controle positivo consistiu em vilos tratados com 0,2% de Triton X-100 (100% de toxicidade). Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para posterior mensuração da lactato desidrogenase (LDH) para determinar a toxicidade das drogas, de acordo com as instruções do fabricante (LDH Liquiform, Labtes Diagnostica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Brevemente, os sobrenadantes coletados foram incubados com o reagente de trabalho (NADH 360 µmol/L; azida sódica 0,095%; tampão 250 mmol/L pH= 7,5; piruvato de sódio) em banho seco a 37 °C por 1 minuto e em seguida, a amostra foi colocada em uma cubeta de cristal para realizar as leituras no espectrofotômetro.

Após 1 minuto da primeira leitura, foi realizada outra leitura para posterior análise. O método utilizado é baseado no consumo e diminuição da absorção de NADH a 340 nm, o qual é dosado no espectrofotômetro DU-70 (Beckman, Brea, C.A., USA). Os dados foram expressos em U/mL da atividade enzimática (CASTRO-FILICE, et al., 2014). Os vilos também foram processados para análise morfológica utilizando a coloração de hematoxilina e eosina. MILLER e colaboradores (2005) mostraram que a análise morfológica dos vilos por microscopia de luz é um dos testes mais importantes para se determinar a viabilidade do tecido *in vitro*, uma vez que o sinciciotrofoblasto é extremamente sensível as condições do meio e se houver mudança na viabilidade, estas células são rapidamente degeneradas. Uma placenta foi usada e os experimentos com as diferentes drogas foram realizados em quintuplicata.

4.5. Tratamentos de células BeWo com drogas: ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* com cepa altamente virulenta RH-clone 2F1

Após avaliar a citotoxicidade dos medicamentos pelo ensaio do MTT em células BeWo, foi avaliada a proliferação intracelular de *T. gondii* usando a cepa altamente virulenta (RH-clone 2F1) em células BeWo tratadas ou não com as diferentes drogas.

Com este propósito, as células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços (3×10^4 /200 μ L/poço) por 24 horas em meio RPMI com 10% SBF a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (clone 2F1) na proporção de 5 parasitos por célula (5:1) em meio a 2% de SBF. Após 3 horas, os sobrenadantes foram removidos e as células foram tratadas como segue, de acordo com os resultados do ensaio de viabilidade celular: (i) apenas com meio (controle negativo), (ii) enrofloxacina (25, 50 ou 100 μ g/mL), (iii) toltrazuril (6,25, 12,5, 25, ou 50 μ g/mL), (iv) sulfadiazina (50, 100 ou 200 μ g/mL – tratamento clássico), (v) pirimetamina (2, 4 ou 8 μ g/mL – tratamento clássico) ou (vi) associação de sulfadiazina e pirimetamina (50 μ g/mL + 2 μ g/mL; 100 μ g/mL + 4 μ g/mL ou 200 μ g/mL + 8 μ g/mL, respectivamente - tratamento clássico). Como controles, as células não foram infectadas e nem tratadas (meio) ou infectadas e não tratadas (*T. gondii*). Após 24 horas em estufa, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA. As células foram submetidas ao ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* através da reação de β -galactosidase (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

Brevemente, as células foram lisadas com 100 μ L de tampão de lise RIPA (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate e 0.1% SDS; pH 7.5)

durante 15 minutos e incubadas com 160 μ L de tampão de ensaio (100 mM PBS, 102 mM β -mercaptoetanol e 9 mM de $MgCl_2$) e 40 μ L de CPRG (*chlorophenol red-D-galactopyranoside*; Roche Diagnostic, Manhein, Alemanha). A atividade da β -galactosidase foi mensurada a 570nm usando leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) e os dados foram apresentados como índice de proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítas) de acordo com a referência da curva padrão de parasitos livres (1×10^6 a $15,625 \times 10^3$). Foram realizados três experimentos independentes em nonoplicata.

4.6. Tratamentos de células BeWo com drogas: ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* com cepa moderadamente virulenta ME-49

Para a avaliação da proliferação intracelular de taquizoítas de *T. gondii* da cepa de virulência intermediária (ME-49), células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas de vidro redondas de 13mm (Sigma) em placas de 24 poços (Caltech, Uberlândia, MG, Brasil) na proporção de 1×10^5 células a cada 200 μ L de meio a 10% de SBF em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 . Após 24 horas, as células foram infectadas com *T. gondii* (ME-49) também na proporção 5:1 durante 3 horas, lavadas com meio para retirada de parasitos não infectantes e tratadas com os mesmos antibióticos (enrofloxacina – 100 μ g/mL, toltrazuril – 12,5 μ g/mL, sulfadiazina - 200 μ g/mL, pirimetamina - 8 μ g/mL ou associação – 200 + 8 μ g/mL), como descrito anteriormente, por adicionais 24 horas em meio a 10% de SBF. Como controles, células foram infectadas, mas não tratadas com antibióticos (*T. gondii*) ou não infectadas e não tratadas (meio). Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80° C para posterior dosagem de citocinas por ELISA. As lamínulas contendo células aderidas foram lavadas em PBS estéril, fixadas em formol 10% durante 24 horas e coradas com azul de toluidina a 1% por 10 segundos (BARBOSA et al., 2008). Em seguida, as células foram analisadas em microscópio de luz para determinar o índice de infecção (número de células infectadas a cada 200 células observadas aleatoriamente) e a proliferação intracelular de *T. gondii* (número de parasitos totais observados nas células infectadas) (BARBOSA et al., 2012). Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicata.

4.7. Tratamentos de explantes de vilos coriônicos humanos com drogas: ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* com cepa altamente virulenta RH-clone 2F1

Após avaliarmos a proliferação de *T. gondii* em células BeWo, nós observamos a proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilos coriônicos humanos tratados ou não com as diferentes drogas. Para isso, os vilos foram coletados como descrito anteriormente no item 3.2, colocados em placas de 96 poços e incubados durante 24 horas em meio RPMI com 10% de SBF a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram infectados com taquizoítas da cepa RH (clone 2F1) de *T. gondii* na proporção de 1×10^6 parasitos por poço. Após 24 horas de incubação, os vilos foram lavados com meio a 10% de soro para a remoção de parasitos extracelulares e tratados por adicionais 24 horas com diferentes concentrações das drogas, como segue: (i) enrofloxacin (700 µg/mL), (ii) toltrazuril (900µg/mL), ou (iii) associação de sulfadiazina e pirimetamina (150 + 200 µg/mL) (controle positivo), de acordo com os resultados do teste de toxicidade. Explantes de vilos não infectados e não tratados ou infectados e não tratados foram cultivados apenas com meio e mantidos como controles negativos do experimento. Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e mantidos a -80 °C para dosagem de citocinas pelo método de ELISA, e os vilos foram coletados para localização de parasitos por imuno-histoquímica ou para a avaliação da proliferação intracelular de *T. gondii* através do ensaio colorimétrico β -galactosidase (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015). Três experimentos independentes foram realizados em nonoplicata.

Para o ensaio da β -galactosidase em amostras de explantes de vilos, foi necessária a adição de 150 µL do tampão RIPA contendo inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Em seguida, os vilos foram macerados para a extração de proteínas, o homogenado foi centrifugado a $20817 \times g$ por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados para mensuração do nível proteico das amostras pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de 20 µL de cada amostra foram utilizadas para a realização do ensaio da β -galactosidase, como descrito acima. Os dados dos números de parasitos foram normalizados de acordo com a concentração de proteína de cada vilo, resultando no número de taquizoítas por µg de tecido. E por fim, os dados foram apresentados como porcentagem de inibição da proliferação de *T. gondii*, como segue: a média do número de taquizoítas de cada controle (explantes de vilos infectados e não tratados) correspondendo a 100% da proliferação do parasito, e o número de taquizoítas de cada condição de tratamento foi calculado subtraindo os valores das porcentagens obtidos nos vilos tratados daqueles obtidos com o controle.

4.8. Análise morfológica e imuno-histoquímica para detecção de parasitos

Para verificar a integridade dos explantes de vilos e a localização dos parasitos, os explantes de vilos foram fixados em formol a 10% após os diferentes tratamentos com antibióticos como acima descrito e foram posteriormente submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool, e então embebidos em parafina. Posteriormente, cortes com 4µm foram realizados em micrótomo e posteriormente colocados em lâminas de vidro para a análise morfológica através da coloração por hematoxilina e eosina. Nos vilos placentários, foram analisados os aspectos morfológicos da interface materno-fetal, compreendendo, portanto, sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e mesênquima.

Os mesmos blocos de parafina contendo os vilos também foram submetidos a imuno-histoquímica para localização de parasitos (FERRO et al., 2002; CASTRO-FILICE et al., 2014). Para a recuperação antigênica, os cortes nas lâminas foram cobertos por solução de ácido cítrico 0,01M pH 6.0 durante 5 minutos em forno microondas. Posteriormente, os cortes de explantes foram incubados com solução de ácido acético a 5% em solução salina tamponada com Tris (TBS) por 8 minutos a temperatura ambiente para ocorrer o bloqueio da atividade de fosfatases endógenas. Em seguida, os cortes foram incubados com soro normal de cabra a 2% em TBS para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação durante 45 minutos a 37 °C e, posteriormente, foi adicionado aos cortes soro de *Calomys callosus* previamente infectado por *T. gondii* (1:100) como anticorpo primário *overnight* a 4 °C. Após este período, foi adicionado o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo biotilado (1:600) por 1 hora a 37 °C e a reação foi revelada com o auxílio de *fast-red naphthol* (Sigma). As amostras foram contra-coradas usando hematoxilina de Harris e finalmente analisadas no microscópio de luz (BX40, Olympus, Tokyo, Japão) (CASTRO-FILICE et al., 2014).

4.9. Dosagem de citocinas por ELISA

As citocinas humanas IL-12p70, IL-6, TNF-α, MIF, IFN-γ, IL-10 e TGF-β1 foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e de vilos placentários provenientes das diversas condições experimentais descritas acima. As dosagens destas citocinas nos sobrenadantes foram realizadas usando o teste imunoenzimático ELISA, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA; R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IL-12p70, anti-IL-6, anti-TNF-α, anti-IFN-γ, anti-IL-10, anti-TGF-β1 (BD Biosciences) *overnight* a 4 °C e

anti-MIF (R&D Systems) *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS Tween 0,05% para posterior bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS a 10% de SBF (IL-12p70, IL-6, IFN- γ , IL-10, TGF- β 1) e PBS a 1% de soro albumina bovina (BSA) para MIF. Após 1 hora, as placas foram novamente lavadas, e as amostras e curvas padrões foram adicionadas e incubadas por mais 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram submetidas a consecutivas lavagens e em seguida os anticorpos de detecção anti-IL-12p70, anti-IL-6, anti-TNF- α , anti-IFN- γ , anti-IL-10, anti-TGF- β 1 conjugados com estreptavidina acoplada a peroxidase foram acrescentados ao sistema por adicionais 1 hora; e anti-MIF por 2 horas, todos a temperatura ambiente. Para MIF, as placas foram lavadas, e foi adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por mais 20 minutos. Por fim, as placas foram lavadas e foi acrescentado 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) para a detecção dos imunocomplexos. Após a placa revelar, foi adicionado H₂SO₄ para parar a reação. A leitura da placa foi realizada em uma leitora de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) a 450 nm. Os dados foram demonstrados em pg/mL de acordo com o último ponto de referência da curva padrão (IL-12p70: 7,8 pg/mL; IL-6: 4,7 pg/mL; TNF- α : 7,8 pg/mL; MIF: 7,8 pg/mL; IFN- γ : 4,7 pg/mL; IL-10: 7,8 pg/mL; TGF- β 1: 125 pg/mL; MIF: 7,8 pg/mL e IFN- γ : 4,7 pg/mL). Após a quantificação dos níveis de citocinas, os dados foram normalizados de acordo com a quantidade de proteína presente em cada vilo após a dosagem pelo método de Bradford. Para isso, o valor obtido no ELISA de cada amostra, foi dividido pelo valor proteico de cada amostra correspondente.

4.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais usando o programa *GraphPad Prisma* versão 4.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA). As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni em casos de testes paramétricos, ou Kruskall Wallis e pós teste de Dunns em casos de testes não paramétricos. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Enrofloxacin e toltrazuril alteram a viabilidade celular apenas nas maiores concentrações

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de avaliar a possível citotoxicidade de enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina mais pirimetamina nas diferentes concentrações testadas em células BeWo (Fig. 1).

O tratamento com enrofloxacin reduziu significativamente a viabilidade celular apenas na concentração de 200 µg/mL, demonstrando uma redução da viabilidade em torno 31% quando comparado com células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 1A). Toltrazuril reduziu a viabilidade das células nas concentrações de 100 µg/mL (26%) e 200 µg/mL (22%) se comparado a células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 1B). Assim, enrofloxacin e toltrazuril reduziram a viabilidade celular significativamente em até 31 e 26%, respectivamente.

Quando células BeWo foram tratadas com sulfadiazina, não houve redução significativa da viabilidade celular se comparado a células não tratadas (Fig. 1C). O tratamento com pirimetamina reduziu a viabilidade celular nas concentrações 4 µg/mL (25%), 8 µg/mL (25%), 12 µg/mL (49%), 16 µg/mL (65%) e 20 µg/mL (82%) em relação a células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 1D). Finalmente, a associação de sulfadiazina mais pirimetamina diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 200 µg/mL + 8 µg/mL (18%) quando comparado a células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 1E).

Baseado nestes resultados, foram escolhidas apenas algumas concentrações dos antibióticos que não alteraram significativamente a viabilidade celular (enrofloxacin, toltrazuril e sulfadiazina), ou que mantiveram pelo o menos 75 a 80% de células viáveis (pirimetamina e associação), para a realização dos experimentos posteriores. As seguintes doses foram escolhidas: 25, 50 ou 100 µg/mL para enrofloxacin; 6,25; 12,5; 25 ou 50 µg/mL para toltrazuril; 50; 100 ou 200 µg/mL para sulfadiazina; 2; 4 ou 8 µg/mL para pirimetamina; e 50 + 2 µg/mL, 100 + 4 µg/mL ou 200 + 8 µg/mL para associação de sulfadiazina e pirimetamina, respectivamente.

5.2. Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH-clone 2F1) em células BeWo

Com o objetivo de avaliar o efeito dos diferentes medicamentos na proliferação intracelular de *T. gondii*, células BeWo foram infectadas e tratadas com as drogas durante 24 horas e foi realizado o ensaio da β -galactosidase (Fig. 2).

Células BeWo tratadas com enrofloxacin nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma redução significativa na proliferação do parasito quando comparado com as células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 2A). Em adição, 100 $\mu\text{g/mL}$ de enrofloxacin foi mais eficaz em controlar a proliferação parasitária se comparado com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$) (Fig. 2A). A concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ não foi suficiente para induzir uma diminuição da proliferação intracelular de *T. gondii* quando comparado com o controle infectado e não tratado (Fig. 2A). O tratamento com o toltrazuril reduziu a proliferação do parasito em todas as concentrações utilizadas em relação a células infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 2B).

Os tratamentos com sulfadiazina e pirimetamina reduziram a proliferação do parasito em todas as concentrações testadas se comparado a células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 2C-D). Ao comparar as diferentes concentrações de pirimetamina (2, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$), as doses de 4 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$ foram significativamente mais eficazes em controlar a infecção do que a dose de 2 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$) (Fig. 2D), e não houve diferenças significativas entre as concentrações de 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2D). Por fim, a associação de sulfadiazina e pirimetamina também reduziu a proliferação de *T. gondii* em todas as doses usadas quando comparado a células não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 2E). Em adição, as doses de 200 + 8 $\mu\text{g/mL}$ foram mais eficazes em diminuir a infecção em comparação com as doses mais baixas (50 + 2 $\mu\text{g/mL}$) de associação ($P < 0.05$) (Fig. 2E).

Com o objetivo de comparar a ação dos diferentes medicamentos ao mesmo tempo, foi realizado um experimento com todas as drogas simultaneamente. Novamente, todos os medicamentos foram capazes de reduzir significativamente a proliferação do parasito quando comparado as células infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 2F). No entanto, enrofloxacin (100 $\mu\text{g/mL}$) mostrou ser mais eficiente no controle da proliferação do parasito quando comparado com toltrazuril (50 $\mu\text{g/mL}$) ($P < 0.05$) (Fig. 2F), entretanto, não houve diferenças significativas se comparado com os tratamentos de sulfadiazina, pirimetamina e associação de sulfadiazina mais pirimetamina (Fig. 2F). Finalmente, sulfadiazina, pirimetamina ou associação

foram mais eficientes no controle da proliferação do parasito do que toltrazuril em células BeWo ($P < 0.05$) (Fig. 2F).

Portanto, enrofloxacin e toltrazuril foram ambos capazes de reduzir significativamente a proliferação intracelular de *T. gondii*, no entanto enrofloxacin foi mais efetiva que toltrazuril em controlar a infecção em células BeWo.

5.3. Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa ME-49) em células BeWo

Foi avaliado também se enrofloxacin e toltrazuril seriam capazes de controlar a proliferação intracelular de *T. gondii* na presença da cepa de moderada virulência, ME-49. Então, contamos o número de células infectadas e o número total de taquizoítas intracelulares, e os dados obtidos foram apresentados como índice de infecção (porcentagem de células infectadas) e a proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítas).

O tratamento com enrofloxacin reduziu significativamente a porcentagem de células infectadas quando comparadas com células infectadas e não tratadas, tratadas com toltrazuril ou sulfadiazina ($P < 0.05$) (Fig. 3A). No entanto, não houve diferenças significantes entre enrofloxacin e os tratamentos com pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina (Fig. 3A). O tratamento com toltrazuril diminuiu a porcentagem de células infectadas quando comparado a células infectadas e não tratadas (Fig. 3A), mas este medicamento foi menos eficiente no controle do índice de infecção se comparado com os tratamentos sulfadiazina, pirimetamina ou associação ($P < 0.05$) (Fig. 3A). Ao avaliar os medicamentos dos clássicos, sulfadiazina, pirimetamina e associação reduziram a porcentagem de células infectadas se comparado a células infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 3A).

Em relação ao número de taquizoítas totais, o tratamento com enrofloxacin reduziu significativamente a proliferação de *T. gondii* nas células BeWo quando comparado ao controle infectado e não tratado e células tratadas com toltrazuril ($P < 0.05$) (Fig. 3B); no entanto, não apresentou diferenças em relação as células tratadas com sulfadiazina, pirimetamina ou associação (Fig. 3B). Toltrazuril diminuiu significativamente a proliferação do parasito em comparação com o controle infectado e não tratado, mas foi menos eficaz no controle do parasitismo quando comparado com os tratamentos com enrofloxacin, sulfadiazina, pirimetamina ou associação ($P < 0.05$) (Fig. 3B). Os tratamentos com sulfadiazina, pirimetamina e associação também reduziram a proliferação do parasito quando comparado com o controle infectado e não tratado ($P < 0.05$) (Fig. 3B).

Fotomicrografias representativas são evidenciadas na Fig. 3C-H, onde é possível observar grande número de taquizoítas em células infectadas e não tratadas (Fig. 3C) em comparação aos tratamentos com enrofloxacina (Fig. 3D), toltrazuril (Fig. 3E), sulfadiazina (Fig. 3F), pirimetamina (Fig. 3G), ou associação (Fig. 3H).

Portanto, enrofloxacina e toltrazuril foram capazes de reduzir significativamente o índice de infecção e o número total de taquizoítas em células BeWo infectadas pela cepa ME-49, no entanto enrofloxacina foi novamente mais eficiente em controlar o parasitismo do que toltrazuril. Resultados similares foram observados entre enrofloxacina e os tratamentos clássicos (sulfadiazina e/ou pirimetamina), exceto para índice de infecção quando enrofloxacina foi mais eficaz se comparado com os tratamentos clássicos.

5.4. Enrofloxacina induz produção de IL-6 e toltrazuril a secreção de MIF em células BeWo infectadas pela cepa RH (clone 2F1)

Após verificar a diminuição da proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH-2F1) em células BeWo tratadas com enrofloxacina, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação, foi realizado o teste ELISA com o sobrenadante das células para verificar se os tratamentos com estes medicamentos foram capazes de alterar o perfil de citocinas secretadas pelas células infectadas e tratadas.

Quando células BeWo foram apenas infectadas com *T. gondii*, houve um aumento significativo na produção de IL-6 se comparado com células não tratadas e não infectadas tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 4A). Células infectadas e tratadas com enrofloxacina produziram significativamente maiores níveis de IL-6 em comparação a células não tratadas e não infectadas ($P < 0.05$) e principalmente em relação a células infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 4A). Por outro lado, toltrazuril não mostrou nenhuma influência significativa na produção de IL-6 quando comparado a células não infectadas e não tratadas ou a células infectadas e não tratadas (Fig. 4A). Quando avaliamos os valores de IL-6 nos tratamentos clássicos, foi possível observar que sulfadiazina, pirimetamina ou associação induziram uma diminuição de IL-6 em comparação a células não tratadas e não infectadas, não tratadas e infectadas, ou células tratadas com enrofloxacina ou toltrazuril ($P < 0.05$) (Fig. 4A).

Em relação a produção de MIF, células BeWo apenas infectadas por *T. gondii* demonstraram alta produção desta citocina se comparado a células não tratadas e não infectadas ($P < 0.05$) (Fig. 4B). Enrofloxacina não induziu altos níveis de MIF em comparação a células não tratadas e não infectadas ou somente infectadas (Fig. 4B). No entanto, toltrazuril promoveu

aumento da produção de MIF quando comparado a células não infectadas e não tratadas ou infectadas e não tratadas ou células tratadas com enrofloxacina ($P < 0.05$) (Fig. 4B). Sulfadiazina e associação promoveram um aumento de MIF em relação a células não tratadas e não infectadas, não tratadas e infectadas ou células tratadas com enrofloxacina ($P < 0.05$) (Fig. 4B), enquanto que baixos níveis de MIF foram observados se comparado com o tratamento com toltrazuril ($P < 0.05$) (Fig. 4B). Por fim, pirimetamina não influenciou a produção de MIF (Fig. 4B).

TGF- β 1, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ e IL-10 apresentaram valores abaixo dos níveis de detecção em todas as condições testadas (dados não mostrados).

Portanto, enrofloxacina e toltrazuril são potentes indutores da produção de IL-6 e MIF, respectivamente, em células BeWo infectadas pela cepa altamente virulenta RH (clone 2F1).

5.5. Enrofloxacina e toltrazuril regulam positivamente a produção de IL-6 e MIF em células BeWo infectadas com *T. gondii* (cepa ME-49)

O perfil de citocinas secretadas pelas células BeWo infectadas com a cepa de moderada virulência (ME-49) e tratadas com os diferentes medicamentos foi analisado após verificar diminuição do parasitismo. Interessantemente, a infecção das células BeWo com a cepa de virulência moderada (ME-49) não foi capaz de aumentar os níveis de produção de IL-6 ou MIF em comparação a células não tratadas e não infectadas, diferentemente da cepa RH (clone 2F1) (Fig. 5A-B). Além disso, a cepa ME-49 também não alterou significativamente a produção de TGF- β 1 ou TNF- α em relação a células não infectadas e não tratadas (Fig. 5C-D).

De modo similar ao observado pela infecção com a cepa RH de *T. gondii*, células BeWo infectadas com a cepa ME-49 e tratadas com enrofloxacina aumentaram significativamente a produção de IL-6 quando comparado a células não infectadas e não tratadas ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 5A). Por outro lado, diferentemente da cepa RH, células tratadas com enrofloxacina e infectadas com ME-49 induziram altos níveis de MIF se comparado a células não infectadas e não tratadas ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 5B). Adicionalmente, enrofloxacina não foi capaz de influenciar na secreção de TGF- β 1 ou TNF- α (Fig. 5C-D). Novamente, similar aos resultados obtidos na infecção pela cepa RH-2F1, células BeWo infectadas com a cepa ME-49 e tratadas com toltrazuril aumentaram significativamente a produção de MIF, e contrariamente a cepa 2F1, toltrazuril induziu maiores níveis de IL-6 em comparação a células não tratadas e não infectadas ou infectadas e tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 5A-B). Diferenças significativas não foram observadas na produção de TGF- β 1, porém baixa

modulação de TNF- α ($P < 0.05$) foi detectada com o tratamento de toltrazuril em relação a células não tratadas e não infectadas ou células tratadas com enrofloxacina (Fig. 5C-D).

Em relação a sulfadiazina, pirimetamina ou associação não provocaram nenhuma influência na produção de IL-6 e TNF- α se comparado a células não tratadas e não infectadas ou somente infectadas, exceto para IL-6 ($P < 0.05$) quando associação foi administrada nas células (Fig. 5A, D). A secreção de MIF foi aumentada nos tratamentos com sulfadiazina e associação quando comparado a células não infectadas e não tratadas ou somente infectadas ($P < 0.05$), enquanto que pirimetamina não causou nenhuma mudança significativa (Fig. 5B). Finalmente, todos os tratamentos clássicos induziram uma baixa produção de TGF- β 1 em comparação a células não infectadas e não tratadas ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$) (Fig. 5C).

As citocinas IL-12p70, IL-10 e IFN- γ não foram detectadas em células BeWo submetidas as condições experimentais (dados não mostrados).

Assim, enrofloxacina e toltrazuril são ambos indutores de IL-6 e MIF em células BeWo infectadas com a cepa de moderada virulência (ME-49).

5.6. Toltrazuril não é tóxico para os explantes de vilos placentários humanos, mas enrofloxacina altera levemente a viabilidade do tecido na maior concentração

Após avaliar a influência de enrofloxacina e toltrazuril em células BeWo infectadas pelas cepas RH ou ME-49, nós analisamos os efeitos destes mesmos medicamentos contra *T. gondii* em explantes de vilos humanos utilizando a cepa de alta virulência (RH).

Inicialmente, foi realizado o ensaio de viabilidade dos vilos. De acordo com a dosagem de LDH, os tratamentos com enrofloxacina (700 μ g/mL), toltrazuril ou associação não alteraram de modo significativo a viabilidade dos vilos placentários em relação ao controle negativo (vilos não tratados) (Fig. 6A). No entanto, enrofloxacina a 800 μ g/mL alterou levemente a viabilidade quando comparado com o controle negativo, embora não tenha sido suficiente para induzir alta mortalidade quando comparado com o controle positivo (100% de toxicidade) ($P < 0.05$) (Fig. 6A). Quando analisamos a morfologia, enrofloxacina, toltrazuril ou associação mantiveram a estrutura do tecido, apresentando sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e mesênquima com morfologia normal quando comparado com o controle (vilos não tratados) (Fig. 6B-E). Assim, as concentrações escolhidas para os próximos experimentos foram: 700 μ g/mL para enrofloxacina, 900 μ g/mL para toltrazuril e 150 + 200 μ g/mL para associação de sulfadiazina e pirimetamina.

5.7. Enrofloxacin e toltrazuril são capazes de controlar o parasitismo em explantes de vilos placentários humanos

A análise da proliferação intracelular de *T. gondii* foi realizada pelo ensaio da β -galactosidase e os dados foram apresentados como porcentagem (%) de inibição da proliferação de *T. gondii*. Enrofloxacin a 700 $\mu\text{g/mL}$ reduziu o parasitismo em torno de 53,77% ($P < 0.05$), toltrazuril na dose de 900 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu a proliferação do parasito em torno de 58,49% ($P < 0.05$), e associação controlou o parasitismo em 70,77% quando comparado a vilos infectados e não tratados ($P < 0.05$) (Fig. 7A).

Fotomicrografias representativas são apresentadas nas figuras 7B-E, onde é possível observar alto número de taquizoítas em vilos infectados e não tratados (Fig. 7B) em comparação os tratamentos com enrofloxacin (Fig. 7C), toltrazuril (Fig. 7D), ou associação (Fig. 7E).

5.8. Enrofloxacin induz liberação de MIF em explantes de vilos placentários humanos

Após avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilos infectados e tratados com diferentes drogas, foi realizado o ensaio de ELISA com o objetivo de verificar o perfil de citocinas produzidas (Fig. 8A-D).

Foi verificado que a infecção por *T. gondii* promoveu uma redução significativa de IL-6 e TNF- α em vilos não tratados em comparação a vilos não tratados e não infectados ($P < 0.05$) (Fig. 8A, D). Embora nós não tenhamos encontrado diferenças estatísticas, a infecção por *T. gondii* também induziu uma tendência a diminuir a liberação de TGF- β 1 em vilos não tratados em relação a vilos não infectados e não tratados (Fig. 8C). A produção de MIF não foi alterada pelo parasito em vilos não tratados (Fig. 8B).

Quando enrofloxacin, toltrazuril ou associação foram adicionados nos vilos infectados, houve redução da produção de IL-6 e TNF- α se comparado a vilos não infectados e não tratados ($P < 0.05$), no entanto não houve diferenças estatísticas em relação a vilos infectados e não tratados (8 A, D), no qual foi demonstrado que o efeito de regular negativamente estas citocinas (IL-6 e TNF- α) é dependente da presença do parasito. Adicionalmente, a tendência de redução da liberação de TGF- β 1 em vilos infectados e tratados também indica ser pela presença do parasito (Fig. 8C).

Interessantemente, o tratamento com enrofloxacin induziu maior produção de MIF em vilos infectados quando comparado com vilos não infectados e não tratados ou infectados e não

tratados ($P < 0.05$) (Fig. 8B). Os outros tratamentos não promoveram efeito na modulação de MIF (Fig. 8B).

As citocinas IL-12p70, IL-10 e IFN- γ não foram produzidas em explantes de vilos sob as condições experimentais utilizadas (dados não mostrados).

Assim, enrofloxacin foi um forte indutor de MIF em vilos infectados com a cepa virulenta (RH, clone 2F1).

6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da infecção induzida por *T. gondii* (CARLIER et al., 2012; OZ, 2014a). A transmissão vertical do parasito pode desencadear aborto ou complicações para o feto, como más formações, problemas neurológicos e/ou oculares (OLARIU et al., 2011; KIEFFER; WALLON, 2013; LI et al., 2014). A resposta imune contra *T. gondii* é uma resposta tipicamente celular (GAZZINELLI et al., 1994). No entanto, esta resposta não é capaz de erradicar completamente o parasitismo, dessa maneira o uso de medicamentos é essencial para controlar a infecção em algumas circunstâncias, especialmente em pacientes imunocomprometidos, gestantes primo infectadas e em crianças infectadas congenitamente.

Assim, com o objetivo de minimizar o risco de transmissão vertical ou manifestações clínicas em recém-nascidos, a combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico quando há infecção fetal, ou espiramicina é tradicionalmente utilizada na clínica médica quando não há infecção do feto (MONTROYA; LIESENFELD, 2008). Estes quimioterápicos tradicionais podem induzir efeitos teratogênicos ou inúmeros efeitos tóxicos, já que a pirimetamina é capaz de promover a supressão da medula óssea e causar efeitos teratogênicos no primeiro trimestre de gestação (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; OZ, 2014a). Dessa maneira, faz se necessário o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para prevenir ou tratar a toxoplasmose congênita. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram o potente efeito de enrofloxacin contra a infecção por *T. gondii* em fibroblastos humanos (BARBOSA et al., 2012). Em adição, outros estudos mostraram o papel protetor de toltrazuril contra a infecção por *Neospora caninum* e *T. gondii* em camundongos C57/BL6 (GOTTSTEIN et al., 2005). No presente estudo, nós avaliamos a eficácia de enrofloxacin, um antibiótico da classe das fluoroquinolonas; e toltrazuril, um anti-coccídio, no controle do parasitismo em células BeWo e em explantes de vilos humanos de terceiro trimestre infectados por *T. gondii*. Ambos são considerados excelentes modelos experimentais para o estudo da transmissão vertical *in vitro*,

já que eles representam células trofoblásticas humanas e a interface materno-fetal, respectivamente (BARBOSA et al., 2008; GOMES et al., 2011; BARBOSA et al., 2014; CASTRO-FILICE et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

Inicialmente, nós verificamos o efeito de enrofloxacin e toltrazuril nas células BeWo. O ensaio de MTT foi realizado para determinar as melhores concentrações dos medicamentos que não alterassem significativamente e/ou fortemente a viabilidade das células. Pirimetamina, mas não sulfadiazina ou associação, reduziram significativamente a viabilidade celular de maneira dose dependente. No entanto, enrofloxacin reduziu significativamente a viabilidade na concentração de 200 µg/mL e toltrazuril diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, mantendo no mínimo 80% de células viáveis. Este é o primeiro estudo que demonstra a tolerância de células trofoblásticas humanas frente aos tratamentos com enrofloxacin ou toltrazuril. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, em que enrofloxacin também diminuiu levemente a viabilidade celular em fibroblastos humanos (HFF) (BARBOSA et al., 2012). Por outro lado, os tratamentos com altas doses de toltrazuril em células HFF promoveram citotoxicidade nestas células, uma vez que baixas concentrações foram capazes de manter 80% da viabilidade (QUIAN et al., 2015). Estes dados sugerem que diferentes populações celulares respondem de maneiras distintas a diferentes tipos de medicamentos.

Adicionalmente, quando verificamos a toxicidade em explantes de vilos humanos, a viabilidade foi mantida em todos os tratamentos, como demonstrado pelo ensaio de LDH e análise morfológica. Embora o ensaio de LDH tenha demonstrado uma leve alteração na viabilidade dos vilos tratados com enrofloxacin a 800 µg/mL, a análise das fotomicrografias mostra que todos os tratamentos utilizados não alteraram a morfologia das células, e os explantes de vilos tiveram sua integridade estrutural mantida, com sinciciotrofoblasto e mesênquima bem preservados. Estudos prévios mostraram que a análise estrutural dos vilos por microscopia de luz é um dos testes mais importantes para se determinar a viabilidade do tecido *in vitro*, porque células como o sinciciotrofoblasto são extremamente sensíveis as condições do meio e se houver mudança na viabilidade, estas células são rapidamente degeneradas, e é possível observar desprendimento destas células e necrose fibrinóide (MILLER et al., 2005). Novamente, este é o primeiro trabalho que demonstra a tolerância de explantes de vilos humanos de terceiro trimestre aos tratamentos com enrofloxacin e toltrazuril. Nosso grupo mostrou que vilos também foram resistentes aos tratamentos com azitromicina e associação de sulfadiazina e pirimetamina (CASTRO-FILICE et al., 2014).

Em seguida, após avaliar a viabilidade das células e dos explantes de vilos durante os tratamentos com os diferentes medicamentos, nós investigamos a proliferação de *T. gondii* nestes modelos experimentais tratados ou não com estas drogas. Nossos resultados demonstraram que enrofloxacin e toltrazuril reduziram a proliferação de *T. gondii* em células BeWo infectadas tanto com a cepa RH quanto com a ME-49. Interessantemente, enrofloxacin demonstrou maior eficácia em controlar o parasitismo nas duas cepas utilizadas quando comparado com toltrazuril. Da mesma maneira, sulfadiazina e/ou pirimetamina também demonstraram ser mais eficientes no controle da proliferação do parasito do que o tratamento com toltrazuril. Assim, independentemente do tipo de cepa, enrofloxacin demonstrou ser uma ótima alternativa para controlar a proliferação de *T. gondii* em células BeWo, apresentando eficácia similar ou maior se comparado aos tratamentos clássicos (sulfadiazina e pirimetamina). No entanto, o tratamento clássico mostrou ser bastante tóxico pelo método do MTT.

Em concordância com nossos resultados, um recente estudo do nosso grupo demonstrou que enrofloxacin foi capaz de controlar o parasitismo por *T. gondii* (cepa RH e ME-49) em ambos os modelos experimentais representados por células HFF e cérebro de roedores *C. callosus* (BARBOSA et al., 2012). Em adição, estudos prévios demonstraram o efeito protetor de outras fluoroquinolonas contra a proliferação de *T. gondii in vitro*, como trovafloxacin (KHAN et al., 1996), gatifloxacin sozinha ou em combinação com pirimetamina ou IFN- γ (KHAN et al., 2001), ciprofloxacin e derivados esterificados deste composto também mostram ser excelentes alternativas no controle do parasitismo em células LLC-MK₂ e mantiveram a sobrevivência de camundongos Swiss após a infecção com a cepa RH (DUBAR et al., 2011; MARTINS-DUARTE et al., 2015). Já é bem conhecido que enrofloxacin é um potente antibiótico utilizado na medicina veterinária, já que sua ação é na DNA girase das bactérias (WILLMOTT et al., 1994), mas não há estudos que aborde o possível efeito direto de enrofloxacin em taquizoítas. Futuros estudos são necessários para verificar essa hipótese.

Toltrazuril é conhecido por controlar infecções causadas por *Eimeria* sp., *Isospora* sp., (HABERKORN, et al., 2001; IQBAL, et al., 2013) e *N. caninum* (KRITZNER et al., 2002; GOSTTEIN et al., 2005; QUIAN et al., 2015). Contudo, muitos estudos têm demonstrado o papel de toltrazuril contra a infecção por *T. gondii*. Ponazuril, o princípio ativo de toltrazuril, é muito prejudicial para os taquizoítas, uma vez que danifica a mitocôndria, e perturbações da divisão celular são induzidas por esta droga no intestino dos hospedeiros definitivos (MITCHELL et al., 2004; KUL et al., 2013). Além do mais, toltrazuril diminuiu em torno de 50% o número de cistos de *T. gondii* na musculatura esquelética e no cérebro de ovelhas (KUL et al., 2013). Um estudo prévio avaliou a ação de enrofloxacin e toltrazuril no controle da

transmissão vertical de *N. caninum* em camundongos C57/BL6. Neste trabalho, ambas as drogas foram capazes de reduzir a neosporose congênita, embora toltrazuril apresentou melhores resultados se comparado com enrofloxacin (GOTTSTEIN et al., 2005). Portanto, embora enrofloxacin e toltrazuril apresentaram papel protetor contra a *T. gondii* em diferentes tipos celulares ou tecidos (BARBOSA et al., 2012; KUL et al., 2013), nosso estudo é o primeiro a demonstrar o controle do parasitismo por cepas de alta ou moderada virulência de *T. gondii* em células BeWo em doses que não interferem na viabilidade celular.

Quando investigamos a proliferação do parasito em explantes de vilos, nós pudemos observar resultados similares em comparação a células BeWo. Nossos dados indicaram que enrofloxacin e toltrazuril foram eficientes em reduzir significativamente a proliferação de *T. gondii* em amostras de vilos, mas não houve diferença significativa em relação ao controle positivo. Assim, enrofloxacin e toltrazuril são também potentes estratégias alternativas para controlar a proliferação de *T. gondii* em explantes de vilos humanos. Apenas um estudo da literatura demonstrou o efeito de drogas alternativas contra *T. gondii* em vilos humanos. Castro-Filice e colaboradores (2014) observou que azitromicina é capaz de controlar a infecção por *T. gondii* em vilos de placenta.

Embora enrofloxacin mostrou os mesmos resultados contra o parasitismo se comparado com sulfadiazina, pirimetamina ou associação, este antibiótico pode ser uma boa terapia alternativa de tratamento para prevenir ou tratar a toxoplasmose congênita, uma vez que os medicamentos tradicionais baseados em sulfadiazina e pirimetamina são frequentemente associados à má absorção, intolerância, problemas fetais incluindo má formação e, em muitos casos, as drogas clássicas podem desencadear resistência dependendo da cepa de *T. gondii* (DOLIWA et al., 2013b), além disso, de acordo com os resultados, as doses que controlaram o parasitismo foram doses que alteraram a viabilidade celular. Adicionalmente, estudos afirmaram que antibióticos da classe das fluoroquinolonas não estão associados a efeitos teratogênicos para os fetos (LARSEN et al., 2001), e não há registros de complicações durante o tratamento na gestação. Este trabalho mostrou a ação protetora de enrofloxacin e toltrazuril em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos infectados com *T. gondii*, mostrando o potencial efeito destes medicamentos em controlar a transmissão vertical do parasito, independentemente da cepa. Após avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* nas células BeWo e em explantes de vilos, foi analisado o perfil de citocinas em célula BeWo infectadas com as cepas do tipo I ou II, e em vilos infectados com a cepa do tipo I. Nossos resultados obtidos a partir do ELISA demonstraram que enrofloxacin e toltrazuril aumentaram a produção de IL-6 ou MIF, respectivamente, em células BeWo infectadas pela cepa RH. Por outro lado,

durante a infecção pela cepa ME-49 em células BeWo, ambos os medicamentos induziram a liberação de IL-6 e MIF. Em relação aos explantes de vilos, IL-6 e TNF- α foram reduzidos em vilos infectados, independente do tratamento. No entanto a produção de MIF foi aumentada quando os explantes de vilos foram tratados com enrofloxacin. Assim, enrofloxacin e toltrazuril são potentes moduladores de citocinas em células trofoblásticas e em vilos, especialmente de IL-6 e MIF.

A produção de citocinas pró-inflamatórias representa um mecanismo de defesa imunológica associada ao controle da infecção por *T. gondii* (MIRPURI; YAROVINSKY, 2012). IL-6 é uma citocina multifuncional secretada por células trofoblásticas e está associada com inúmeras funções biológicas, incluindo inflamação, regulação da resposta imune, diferenciação celular, proliferação, migração e apoptose, todas as funções são essenciais para o desenvolvimento normal da placenta e o sucesso da gestação (NAKA et al., 2002; PRINS et al., 2012; GOYAL et al., 2013).

Muitos estudos relacionaram IL-6 como uma citocina pró-inflamatória devido ao papel protetor contra alguns parasitos, como *T. gondii* (MIRPURI; YAROVINSKY, 2012; CASTRO et al., 2013), incluindo em células trofoblásticas BeWo (BARBOSA et al., 2015). Também, a secreção de IL-6 em células BeWo mostrou ser importante para o controle de *T. gondii* em monócitos humanos (CASTRO et al., 2013). Outros estudos têm demonstrado uma função protetora importante de IL-6 contra outros patógenos além de *T. gondii*, como *Trypanosoma cruzi*, (GAO; PEREIRA, 2002) e *Giardia duodenalis* (KAMDA et al., 2012). Contudo, é possível sugerir que enrofloxacin e toltrazuril são capazes de controlar o parasitismo em células BeWo, uma vez que estes medicamentos interferem na resposta desencadeando a produção de IL-6 nestas células. Esta citocina induzida por ambos os medicamentos, provavelmente potencializa o efeito dos mesmos, reduzindo a proliferação do parasito em células BeWo infectadas pelas cepas RH ou ME-49. No entanto, não podemos excluir o efeito direto de enrofloxacin em taquizoítas, mas futuras investigações são necessárias para comprovar esta hipótese.

MIF é outra citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune adaptativa e inata (KIM et al., 2002). Além do mais, MIF é uma citocina importante na imunologia da reprodução, uma vez que é secretada por células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos de primeiro e terceiro trimestre de gestação (FERRO et al., 2008; FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2011; BARBOSA et al., 2014). Em adição, MIF tem um papel fundamental durante a infecção por muitos parasitos, incluindo *Leishmania major* (SATOSKAR et al., 2001) e *T. cruzi* (REYES et al., 2006), e muitos estudos tem elucidado sua importância contra a infecção por *T. gondii*

(FERRO et al., 2008; FLORES et al., 2008; GOMES et al., 2011; BARBOSA et al., 2014). Assim, é possível sugerir que enrofloxacin ou toltrazuril foram capazes de controlar o parasitismo nas células BeWo, uma vez que interferem no sistema imune, desencadeando a produção de MIF nestas células.

É interessante observar que a produção de IL-6 e MIF desencadeada por enrofloxacin ou toltrazuril foi dependente da cepa de *T. gondii*. Foi possível observar que ambos os medicamentos foram capazes de regular positivamente estas citocinas, mas o tipo de cepa foi capaz de modular esta produção. Durante a infecção pela cepa RH, enrofloxacin e toltrazuril foram somente capazes de induzir a produção de IL-6 ou MIF, respectivamente; enquanto que durante a infecção por ME-49, ambos desencadearam ambas as citocinas. Então, é possível concluir que ME-49 é uma cepa que induz uma potente resposta pró-inflamatória, embora seja uma cepa de moderada virulência. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que a infecção com ME-49 induziu uma produção de citocinas pró-inflamatórias em célula BeWo, como MIF, TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-17, quando comparado a células infectadas pela cepa RH (ANGELONI et al., 2013).

Em explantes de vilos, foi observado uma modulação negativa de IL-6 e TNF- α após a infecção por *T. gondii* e tratadas ou não com enrofloxacin ou toltrazuril. Estes resultados representam uma estratégia do parasito em subverter a resposta imune e evadir dessa resposta protetora. Esta é uma possível hipótese para explicar a baixa produção de citocinas em vilos infectados, uma vez que nesses tecidos há uma grande variedade de tipos celulares, incluindo citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto e macrófagos. Neste contexto, podemos sugerir que outros mecanismos estão envolvidos no controle do parasitismo em explantes de vilos e também nas células BeWo, além da resposta imune desencadeada por estes medicamentos. No entanto, a produção de MIF é alta quando enrofloxacin foi adicionado, provando mais uma vez a importância dessa citocina em reduzir o parasitismo em células BeWo e em explantes de vilos humanos

Concluindo, nosso estudo demonstrou que enrofloxacin e toltrazuril são capazes de controlar o parasitismo em células BeWo e em explantes de vilos placentários humanos infectados com *T. gondii*, e a eficiência dos mesmos pode estar relacionada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6 e MIF. Assim, enrofloxacin e toltrazuril podem ser estratégias alternativas para prevenir e tratar a toxoplasmose congênita. No entanto, estudos utilizando modelos *in vivo* são necessários para entender e avaliar o real mecanismo destes medicamentos em controlar a passagem do parasito pela interface materno-fetal.

FIGURAS

Figura 1: Viabilidade de células BeWo tratadas com diferentes medicamentos. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço/200 μ L) por 24 horas e tratadas com enrofloxacina (**A**), toltrazuril (**B**), sulfadiazina (**C**), pirimetamina (**D**) ou associação de sulfadiazina mais pirimetamina (**E**) em doses crescentes. Após 24 horas de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de MTT e os dados foram apresentados como (%) de células viáveis (viabilidade celular) em relação as células não tratadas (100% de viabilidade). Os resultados foram mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em nonoplicata. Diferenças significativas em relação as células não tratadas (meio) ($^{\#}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA utilizando pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Figura 1

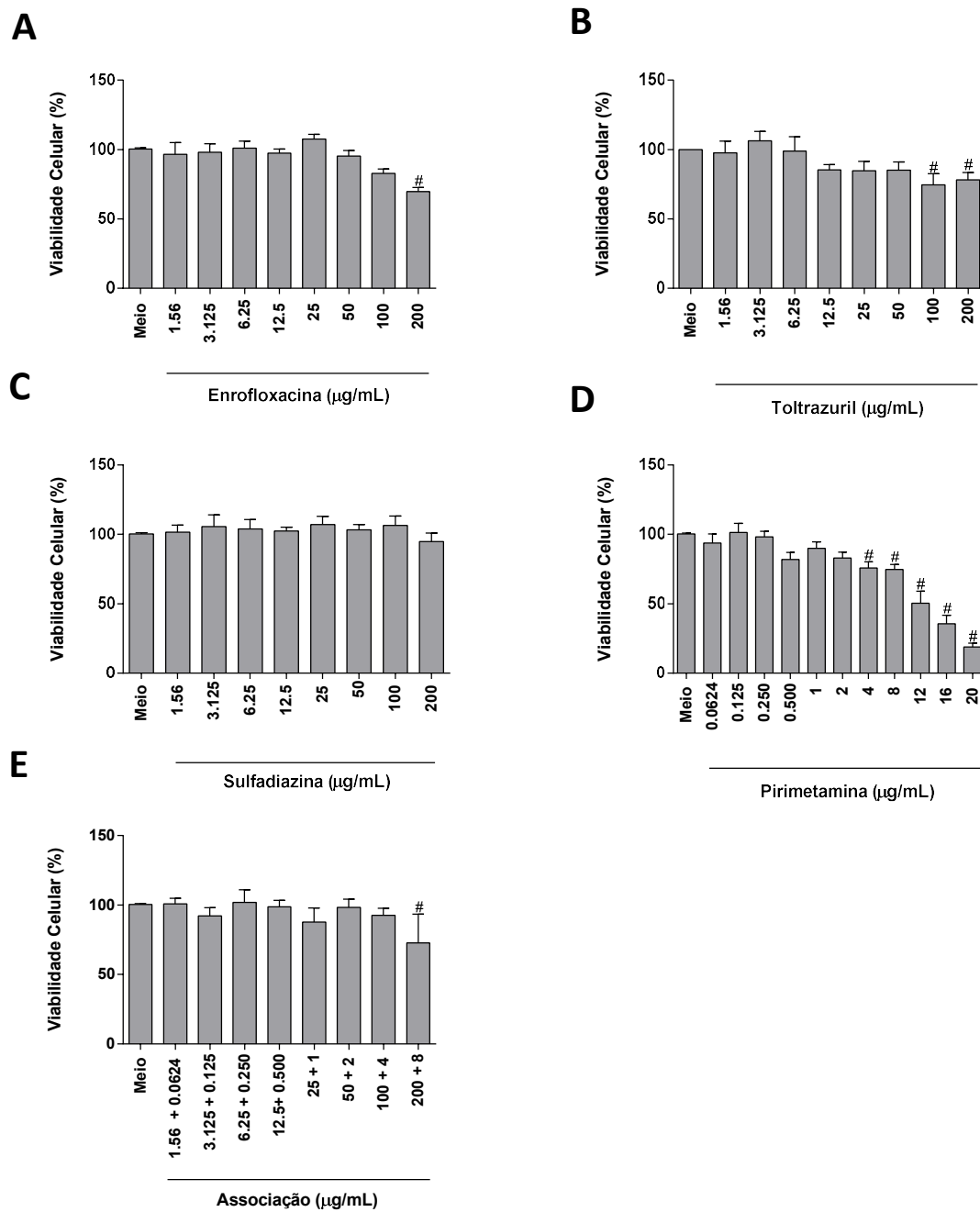


Figura 2: Proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) em células BeWo tratadas com diferentes drogas. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços 3×10^4 células/poço/200 μ L) por 24 horas e infectadas com *T. gondii* (clone 2F1) durante 3 horas, lavadas com meio para remover os parasitos extracelulares e tratadas separadamente (placas diferentes) com enrofloxacina (**A**), toltrazuril (**B**), sulfadiazina (**C**), pirimetamina (**D**) ou associação de sulfadiazina mais pirimetamina (**E**) por adicionais 24 horas em diferentes concentrações. Ao mesmo tempo, células BeWo foram infectadas e tratadas na mesma placa com as diferentes drogas: enrofloxacina, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina (**F**) por também 24 horas. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (ensaio da β -galactosidase). Os dados foram expressos com média $\pm$ SEM do número de taquizoítas em relação a curva padrão de taquizoítas livres. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Diferenças significativas em relação a células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) (* $P < 0.05$), enrofloxacina (& $P < 0.05$), toltrazuril (\$ $P < 0.05$), pirimetamina (• $P < 0.05$), e associação (° $P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Figura 2

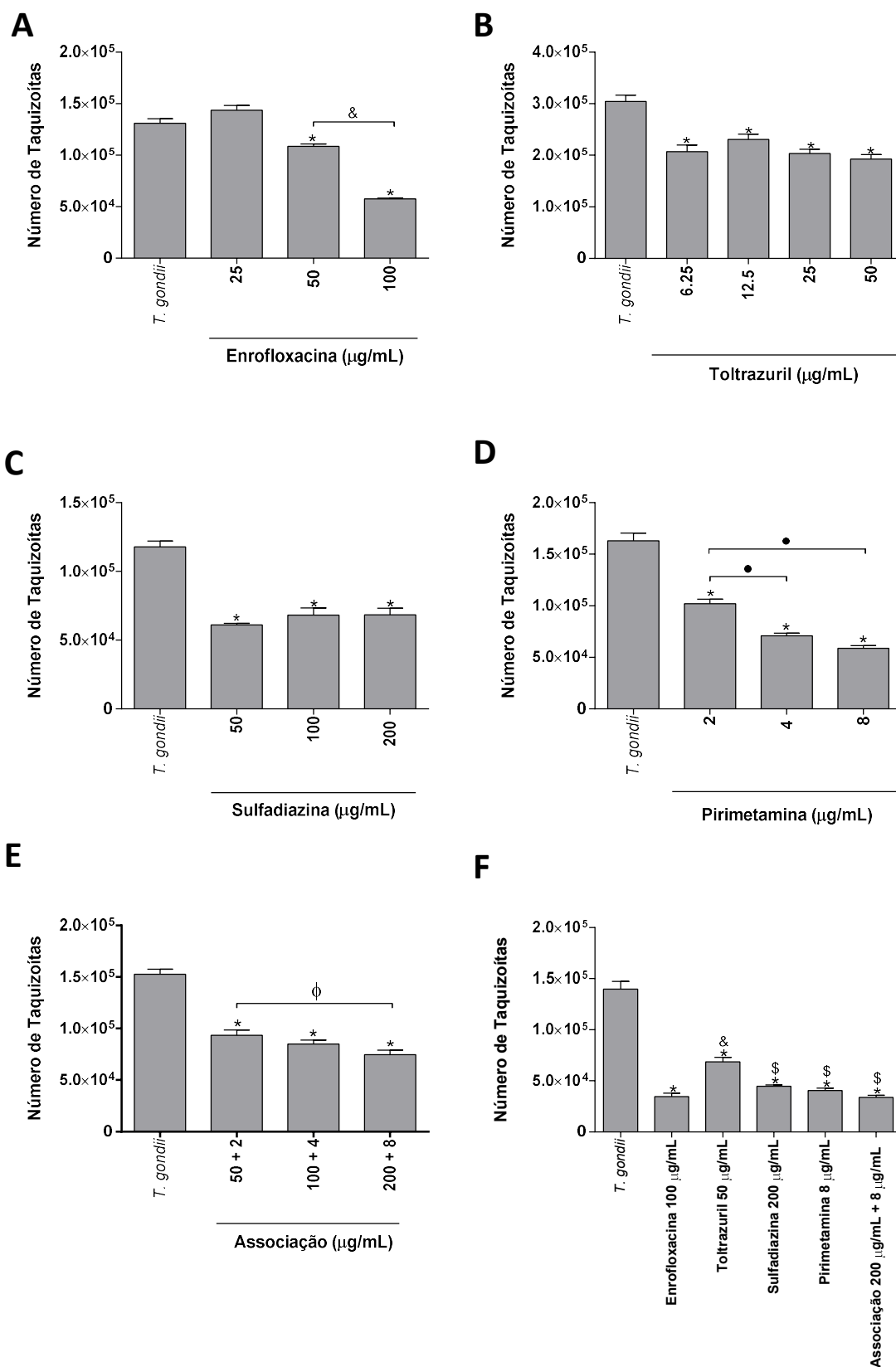


Figura 3: Infecção por *T. gondii* (cepa ME-49) em células BeWo tratadas com os diferentes medicamentos. Células BeWo foram cultivadas em lamínulas redondas de 13mm em placas de 24 poços ($1 \times 10^5/200 \mu\text{L}$) por 24 horas, infectadas com a cepa ME-49 por 3 horas, lavadas com meio para remoção dos parasitos extracelulares e tratadas na mesma placa com as diferentes drogas: enrofloxacina, toltrazuril, pirimetamina, sulfadiazina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina por adicionais 24 horas. Então, as células foram coradas com azul de toluidina a 1% e contadas usando o microscópio de luz. Os dados obtidos foram analisados quanto ao índice de infecção (% de células infectadas) **(A)** e o total número de taquizoítas **(B)**. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em sextuplicata. Diferenças significativas em relação a células infectadas de não tratadas (*T. gondii*) ($^*P < 0.05$), enrofloxacina ($^{\&}P < 0.05$), e toltrazuril ($^{\$}P < 0.05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Fotomicrografias representativas de células BeWo infectadas por *T. gondii* e não tratadas **(C)**, ou tratadas com enrofloxacina **(D)**, toltrazuril **(E)**, sulfadiazina **(F)**, pirimetamina **(G)** ou associação **(H)**. Coloração com azul de toluidina. Setas indicam parasitos dentro de vacúolos parasitóforos. Barra: 20 ou 50 μm .

Figura 3

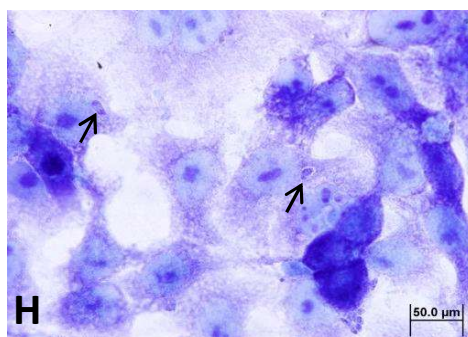
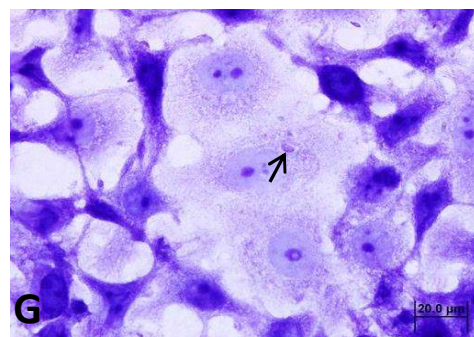
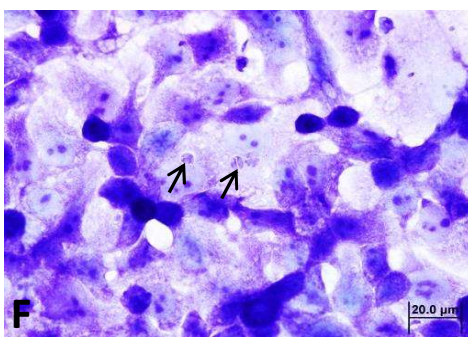
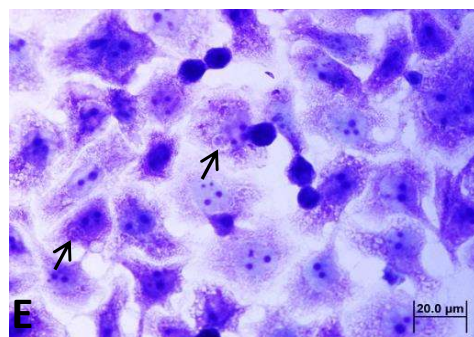
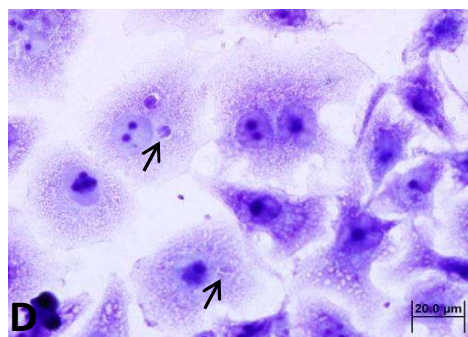
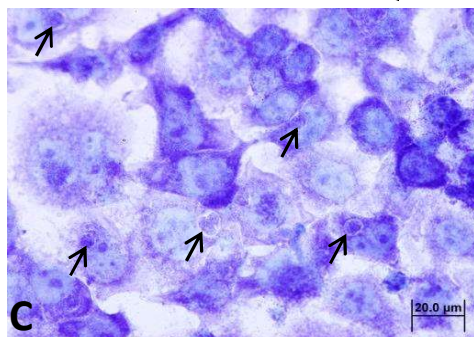
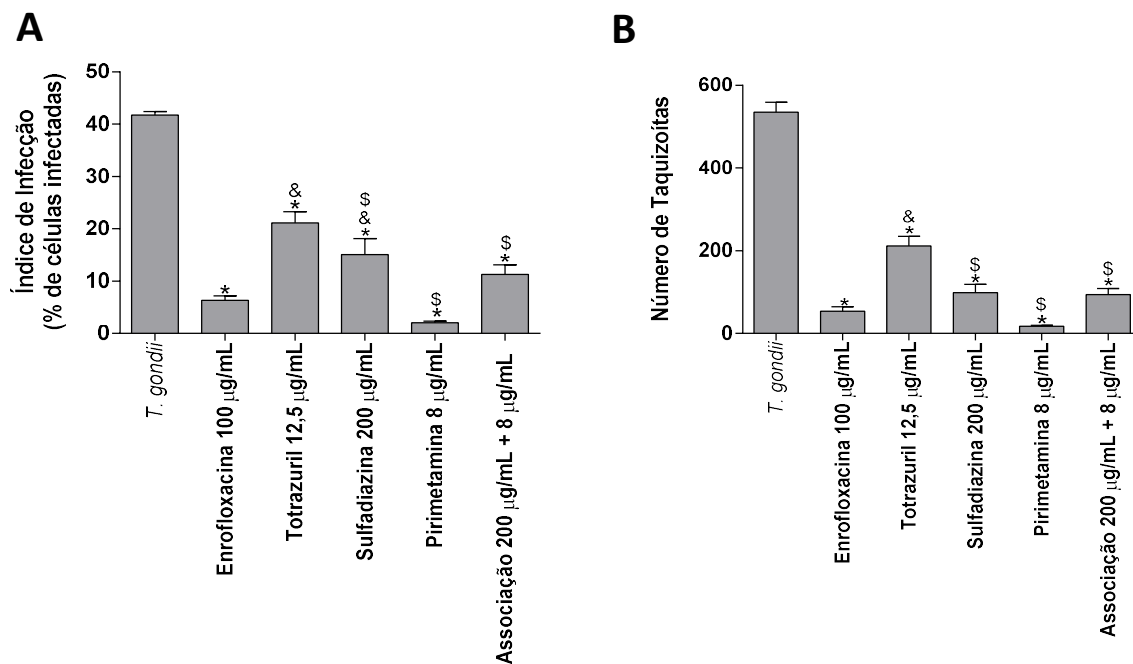


Figura 4: Produção de citocinas em células BeWo tratadas com enrofloxacina, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação e infectadas pelo clone 2F1 de *T. gondii*. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço/200 μ L) por 24 horas, infectadas com *T. gondii* (clone 2F1) por 3 horas, lavadas com meio para remoção de parasitos extracelulares e tratadas com enrofloxacina, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina pirimetamina por adicionais 24 horas. Em seguida os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-6 (**A**) e MIF (**B**). Os resultados foram expressos com pg/mL acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Os dados foram apresentados com média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em nonoplicata. Diferenças significativas em relação a células não infectadas e não tratadas (meio) ($^{\#}P < 0.05$), células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($^{*}P < 0.05$), enrofloxacina ($^{\&}P < 0.05$), e toltrazuril ($^{\$}P < 0.05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Figura 4

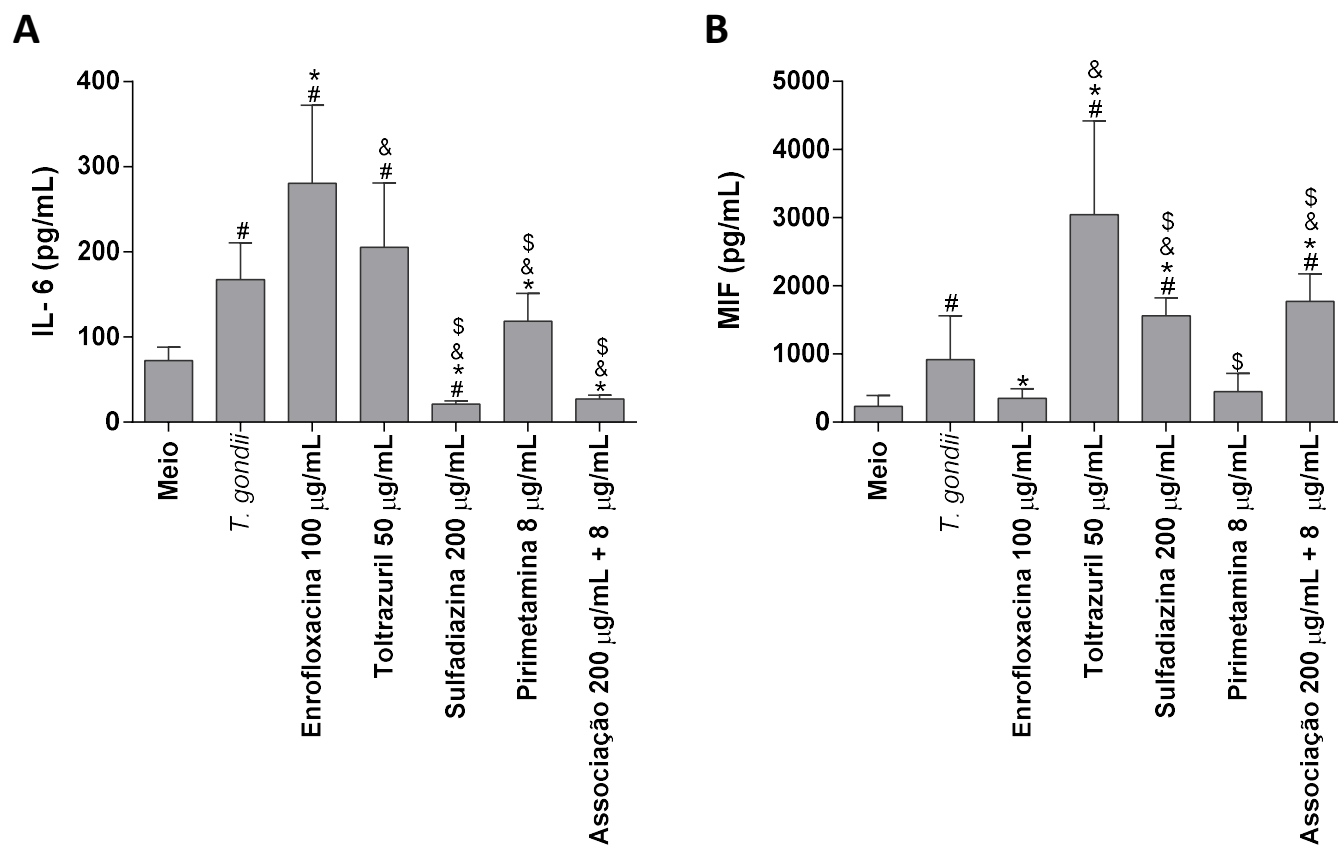


Figura 5: Produção de citocinas em células BeWo tratadas com enrofloxacina, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação e infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii*. Células BeWo foram cultivadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço/200 μ L) por 24 horas, infectadas com *T. gondii* (cepa ME-49) por mais 3 horas, lavadas com meio para remoção dos parasitos extracelulares e tratadas com enrofloxacina, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina por adicionais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados para a detecção de IL-6 (**A**), MIF (**B**), TGF- β 1 (**C**) ou TNF- α (**D**). Os resultados foram expressos com pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Os dados foram apresentados com média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em sextuplicata. Diferenças significativas em relação a células não tratadas e não infectadas (meio) ($^{\#}P < 0.05$), células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($^*P < 0.05$), enrofloxacina ($^{\&}P < 0.05$), e toltrazuril ($^{\$}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis com comparações múltiplas de Dunn.

Figura 5

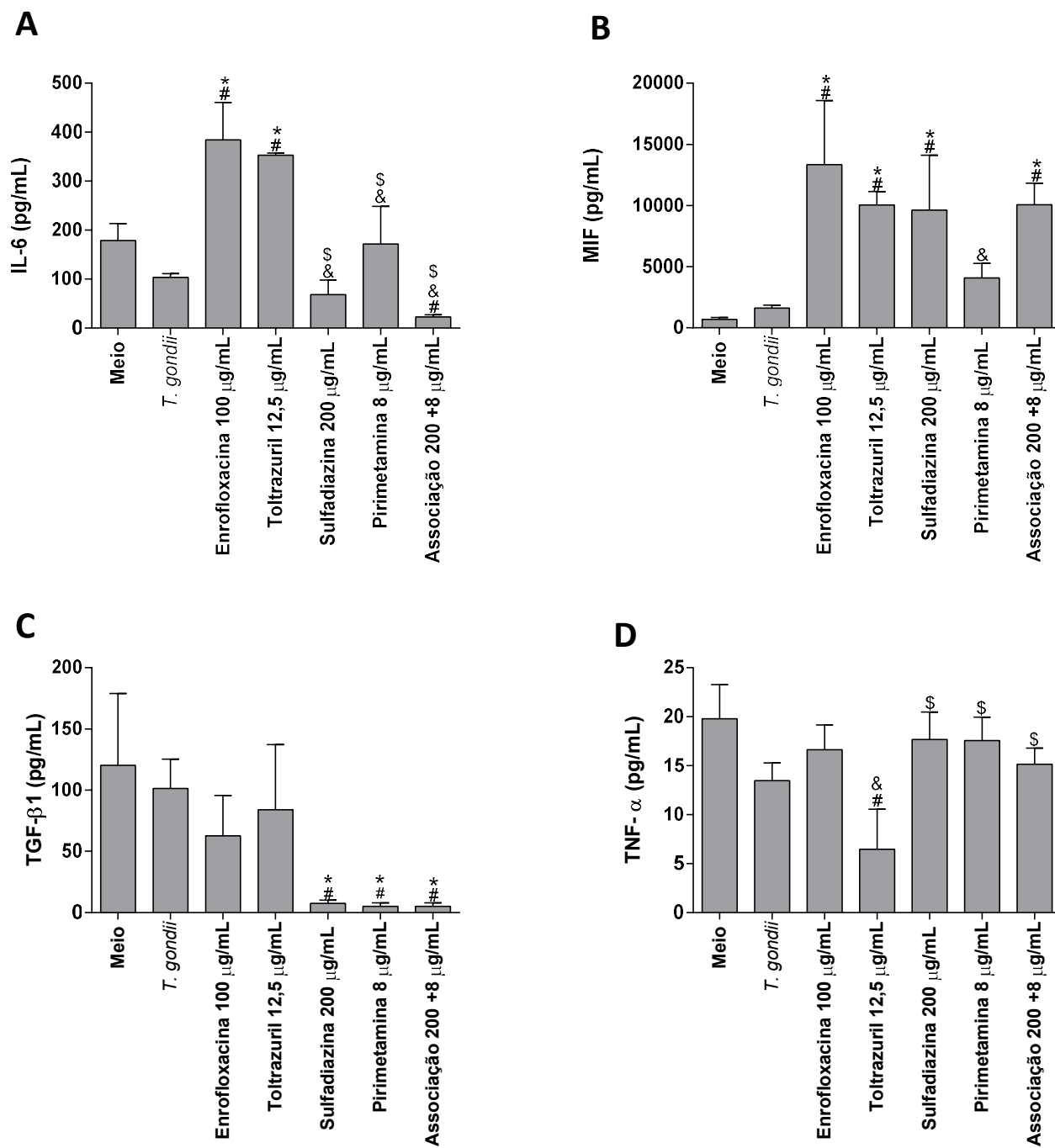


Figura 6: Análise da citotoxicidade em explantes de vilos placentários humanos.

Explantes de vilos placentários foram cultivados em placas de 96 poços e tratadas com diferentes drogas: enrofloxacina, toltrazuril ou associação de sulfadiazina mais pirimetamina. Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e foi mensurado a atividade da lactato desidrogenase (LDH) usando o Kit LDH Liquiform (**A**). O controle positivo representa vilos tratados com 0,2% de Triton X-100, enquanto que o controle negativo corresponde a vilos placentários tratados apenas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Os dados foram expressos com mediana $\pm$ SEM de um experimento em quintuplicata. Diferenças significativas em relação ao controle positivo ($*P < 0.05$) ou controle negativo ($^{\#}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis com pós testes de comparações múltiplas de Dunn. Fotomicrografias representativas de explantes de vilos não tratados (**B**), ou tratados com enrofloxacina (700 $\mu\text{g/mL}$) (**C**), toltrazuril (900 $\mu\text{g/mL}$) (**D**), ou associação (150 $\mu\text{g/mL}$ + 200 $\mu\text{g/mL}$) (**E**). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. As setas indicam o sinciciotrofoblasto e os asteriscos o mesênquima. Barras: 50.0 μm .

Figura 6

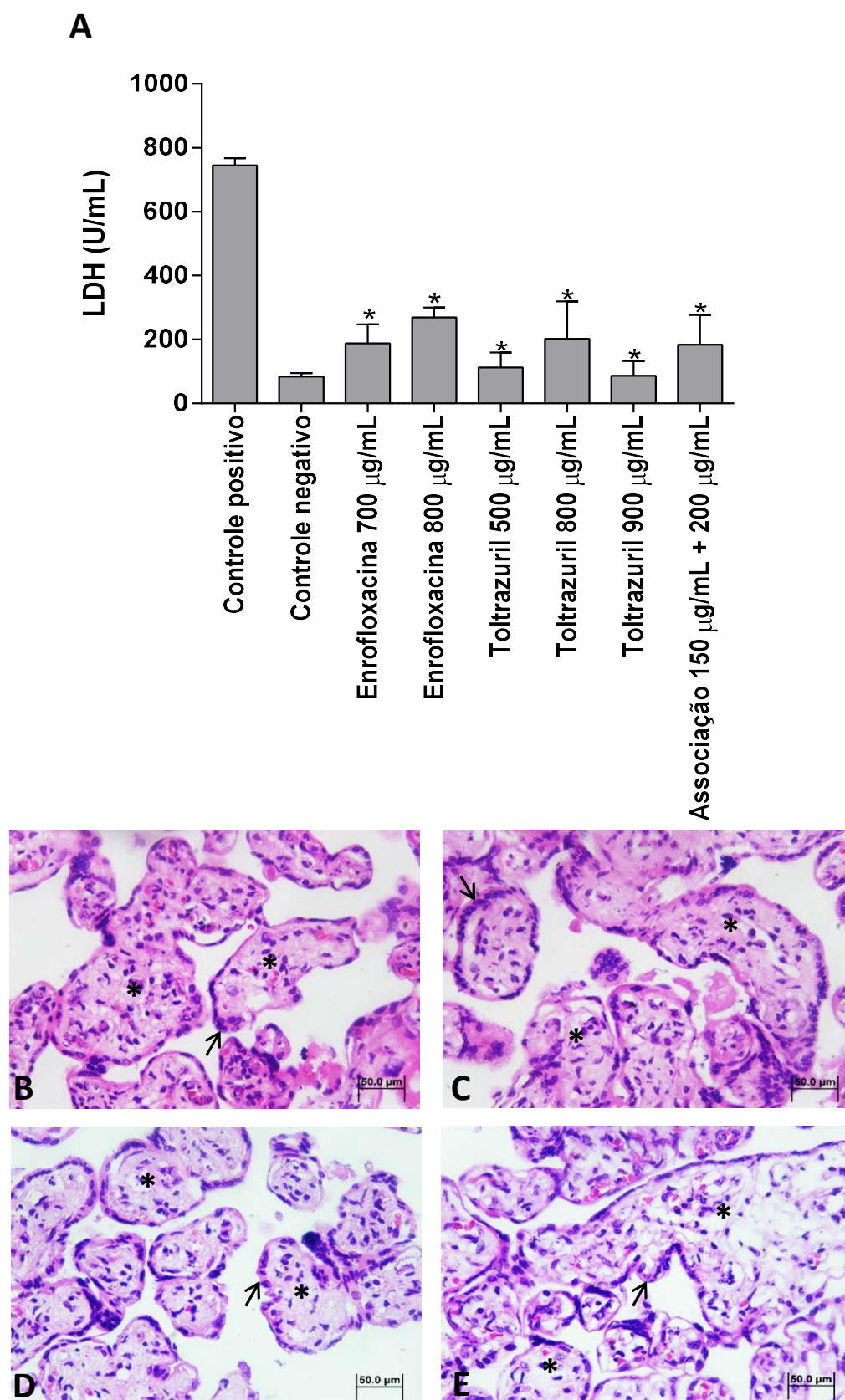


Figura 7: (%) de inibição da proliferação de *T. gondii* em vilos placentários. Os vilos foram coletados e cultivados em placas de 96 poços durante 24 horas, infectados com a cepa RH (clone 2F1) de *T. gondii*, e após 24 horas foram tratados com enrofloxacina, toltrazuril ou associação de sulfadiazina e pirimetamina por adicionais 24 horas. Em seguida, explantes de vilos foram macerados para a realização do ensaio da β -galactosidase (**A**). Os dados foram analisados como (%) de inibição da proliferação de *T. gondii* de cada tratamento em relação à média dos controles, vilos placentários não infectados e não tratados (100% de proliferação do parasito, linha tracejada). Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM de três amostras de placentas em três experimentos independentes em nonoplicata. Diferenças significativas em relação aos vilos placentários não infectados e não tratados ($^{\#}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Fotomicrografias representativas de explantes de vilos infectados e não tratados (**B**), ou tratados com enrofloxacina (**C**), toltrazuril (**D**), ou associação (**E**). Cortes foram submetidos a imuno-histoquímica e contra corados com Hematoxilina de Harris. Setas indicam imunolocalização dos parasitos por *fast red naphthol*. Barras: 50.0 μ m ou 20.0 μ m.

Figura 7

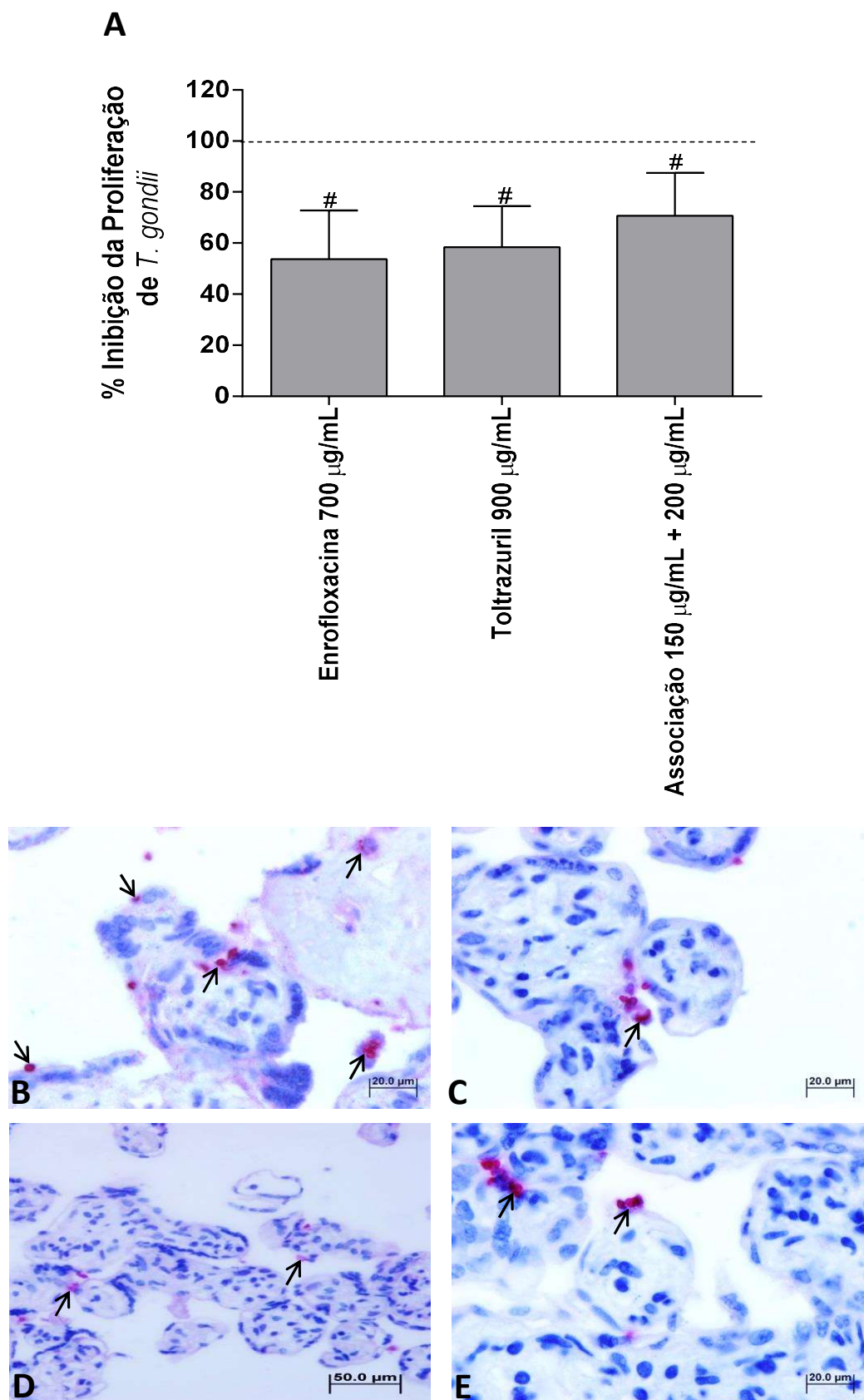
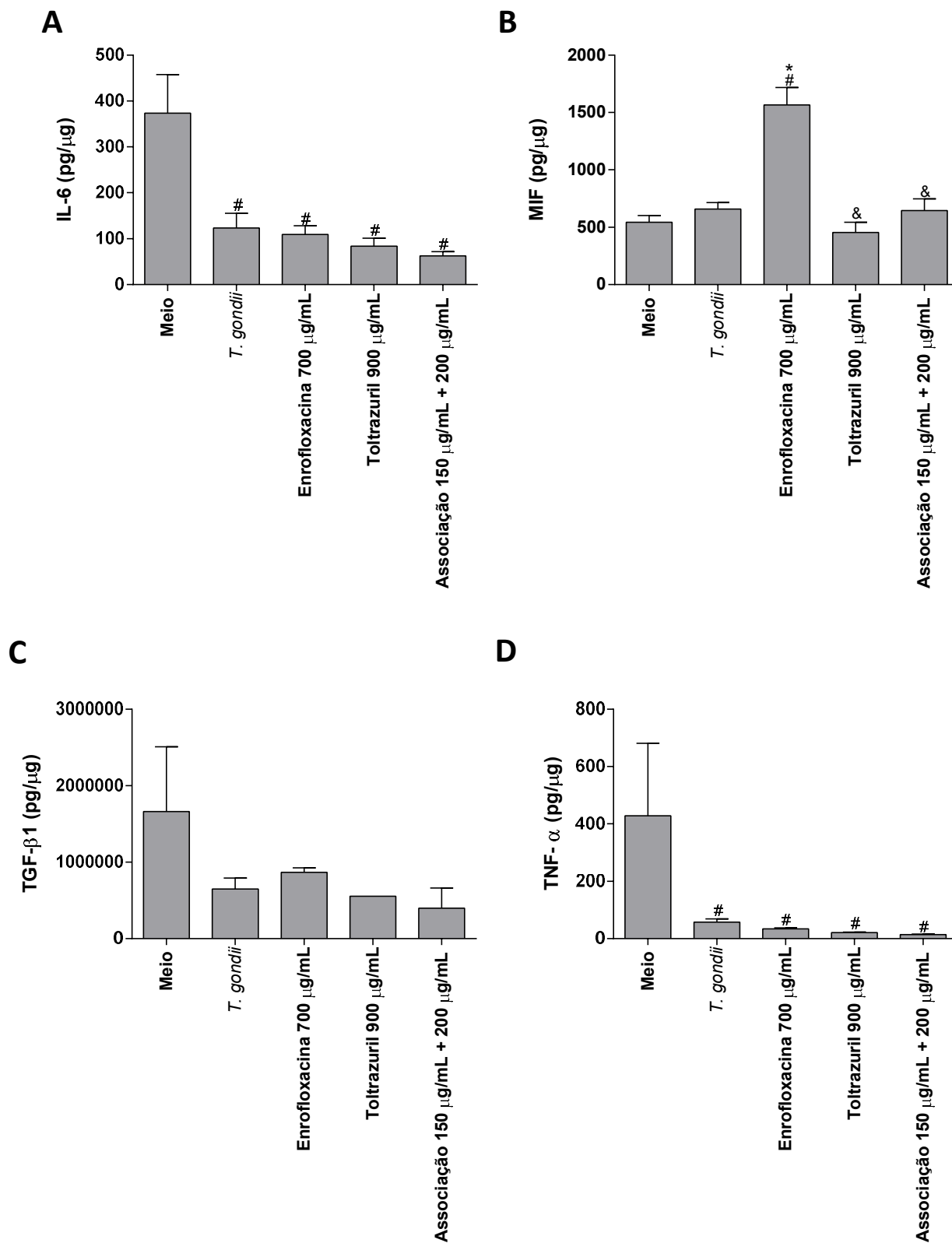


Figura 8: Produção de citocinas em explantes de vilos tratados com enrofloxacina, toltrazuril, ou associação e infectados com a cepa RH de *T. gondii*. Explantes de vilos placentários foram coletados e cultivados em placas de 96 poços durante 24 horas e infectados com a cepa RH (clone 2F1) de *T. gondii*, e após 24 horas foram tratados com enrofloxacina, toltrazuril, ou associação de sulfadiazina e pirimetamina por adicionais 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados para detecção de IL-6 (**A**), MIF (**B**), TGF- β 1 (**C**) e TNF- α (**D**). Os dados foram expressos como pg/ μ g de acordo com a curva padrão de cada citocina analisada. Os dados foram apresentados como média $\pm$ SEM de três amostras de placentas em três experimentos independentes realizados em nonoplicata. Diferenças significativas em relação a vilos não infectados e não tratados ($^{\#}P < 0.05$), vilos placentários infectados e não tratados (*T. gondii*) ($^{*}P < 0.05$), e enrofloxacina ($^{\&}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas por One-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Figura 8



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, O.; KAWAI, T.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, M.; TSUTSUI, H.; SAKAGAMI, M.; NAKANISHI, K.; AKIRA, S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 143-150, 1998.
- AMBROISE-THOMAS, P. Parasitic diseases and immunodeficiencies. **Parasitology**, v. 122, p. 65-71, 2001.
- ANDRADE, R. M.; WESSENDARP, M.; GUBBELS, J. M.; STRIEPEN, B.; SUBASTE, C. S. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 9, p. 2366–2377, 2006.
- ANGELONI, M. B.; GUIRELLI, P. M.; FRANCO, P. S.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; CASTRO, A. S.; SILVA, N. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 973-982, 2013.
- ARISUE, N.; HASHIMOTO, T. Phylogeny and evolution of apicomplasts and apicomplexas parasites. **Parasitol Int.**, v. 64, n. 3, p. 254-259, 2015.
- BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; FERRO, E. A. V.; NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Vet Parasitol.**, v. 187, n. 2, p. 44-52, 2012.
- BARBOSA, B. F.; LOPES-MARIA, J. B.; GOMES, A. O.; ANGELONI, M. B.; CASTRO, A. S.; FRANCO, P. S.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; IETTA, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. IL-10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biol Reprod.**, v. 92, n. 3, p. 82-92, 2015.
- BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E₂ production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-162, 2014.
- BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clin Exp Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008.
- BARGIERI, D.Y.; ANDENMATTEN, N.; LAGAL, V.; THIBERGE, S.; WHITELAW, J.A.; TARDIEUX, I.; MEISSNER, M.; MÉNARD, R. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. **Nat Commun.**, v. 4, n. 2552, p. 1-3, 2013.

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

BISWAS, S.; MAGGI, R. G.; PAPICH, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Molecular mechanisms of *Bartonella henselae* resistance to azithromycin, pradofloxacin and enrofloxacin. **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, n. 3, p. 581-582, 2010.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS.**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr Opin Microbiol.**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BOSCO, A.; RINALDI, L.; CAPPELLI, G.; SARATSIS, A.; NISOLI, L.; CRINGLI, G. Metaphylactic treatment strategies with toltrazuril and diclazuril and growth performance of buffalo calves exposed to a natural *Eimeria* infection. **Vet Parasitol.**, v. 212, n. 3-4, p. 408-410, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUXTON, D.; MARLEY, W. S.; ERIGHT, S. E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Vet Parasitol.**, v. 149, n. 1-2, p. 25-28, 2007.

CARELLOS, A. S.; CARNEIRO, A. C.; BÉLA, S. R.; ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS-SANTO, D. V.; JANUÁRIO, J. N.; COELHO-DOS-REIS, J. G.; FERRO, E. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VITOR, R. W.; MARTINS-FILHO, O. A. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

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

CASTRO, A. S.; ALVES, C. M. O. S.; ANGELONI, M. B.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; SILVA, D. A. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; FERRO, E. A. V. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240-247, 2013.

CASTRO-FILICE, L. S.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; GOMES, A. O.; ALVES, C. M. O. S.; SILVA, D. A. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **J Transl Med.**, v. 132, n. 12, p. 1-12, 2014.

CARVALHO, J. V.; ALVES, C. M. O. S.; CARDOSO, M. R. D.; MOTA, C. M.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.

Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol.**, v. 40, n. 14, p. 1629-1637, 2010.

CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J. S.; MADI, K.; FEIJÓ, D. F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; SOUZA, H. S. P.; BOZZA, M. T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2011.

CÉRÈDE, O.; DUBREMETZ, J. F.; SOËTE, M.; DESLÉE, D.; VIAL, H.; BOUT, D.; LEBRUN, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **J Exp Med.**, v. 201, n. 3, p. 453-463, 2005.

CHALLIS, J. R.; LOCKWOOD, C. J.; MYATT, L.; NORMAN, J. E.; STRAUSS III, J. F.; PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. **Reprod Sci.**, v. 16, n. 2, p. 206-215, 2009.

COOK, A.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T.; Sources of toxoplasma infection in pregnant women. European multicentre case-control study. **BMJ.**, v. 15, n. 7254, p. 142-147, 2000.

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. O.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, v. 30, n. 10, p. 884-890, 2009.

DANTAS-LEITE, L.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Selective anti-*Toxoplasma gondii* activities of azasterols. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 23, n. 6, p. 620-626, 2004.

DARIUS, A. K.; MEHLHORN, H.; HEYDORN, A. O. Effects of toltrazuril and ponazuril on the fine structure and multiplication of tachyzoites of the NC-1 strain of *Neospora caninum* (a synonym of *Hammondia heydorni*) in cell cultures. **Parasitol Res.**, v. 92, n. 6, p. 453-458, 2004.

DELESPAUX, V.; VITOULEY, H. S.; MARCOTTY, T.; SPEYBROECK, N.; BERKVENS, D.; ROY, K.; GEERTS, S.; VAN DEN BOSSCHE, P. Chemosensitization of *Typanosoma congolense* strains resistant to isometadum chloride by tetracyclines and enrofloxacin. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 9, p. e828, 2010.

DEROUIN, F.; CHASTANG, C. In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 33, n. 10, p.1753-1759, 1989.

DEVREESE, M.; ANTONISSEN, G.; BAERE, S. D.; BACKER, P. D.; CROUBELS, S. Effect of administration route and dose escalation on plasma and intestinal concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin in broiler chickens. **BMC Vet Res.**, v. 10, p. 1-9, 2014.

DIRIKOLU, L.; YOHAN, R.; GARRETT, E. F.; CHAKKATH, T.; FERGUSON, D.C. Detections, quantifications and pharmacokinetics of toltrazuril sulfone (Ponazuril) in cattle. **J. Vet Pharmacol Therap.**, v. 32, n. 3, p. 280-288, 2008.

DOLIWA, C.; ESCOTTE-BINET, S.; AUBERT, D.; SAUVAGE, V.; VELARD, F.; SCHMID, A.; VILLENA, I. Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters. **Parasite**, v. 20, n. 19, p. 1-6, 2013a.

DOLIWA, C.; ESCOTTE-BINET, S.; AUBERT, D.; VELARD, F.; SCHMID, A.; GEERS, R.; VILLENA, I. Induction of sulfadiazine resistance in vitro in *Toxoplasma gondii*. **Exp Parasitol.**, v. 133, n. 2, p. 131-136, 2013b.

DUBAR, F.; WINTJENS, R.; MARTINS-DUARTE, E. S.; VOMMARO, R. C.; SOUZA, W.; DIVE, D.; PIERROT, C.; PRADINES, B.; WOHLKONIG, A.; KHALIFE, J.; BIOT, C. Ester prodrugs of Ciprofloxacin as DNA-gyrase inhibitors: synthesis, antiparasitic evaluation and docking studies. **Med Chem Commun.**, v. 2, n. 5, p. 430-435, 2001.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2 ed. Flórida: Boca Raton, 2010.

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**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradizoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

ELMAS, M.; UNEY, K.; YAZAR, E.; KARABACAK, A.; TRAS, B. 2007. Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous and intramuscular administration in *Angora rabbits*. **Res Vet Sci.**, v. 82, n. 2, p. 242-245, 2007.

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

FATOOHI, A. F.; COZON, G. J.; GREENLAND, T.; FERRANDIZ, J.; BIENVENU, J.; PICOT, S.; PEYRON, F. Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 704-707, 2002.

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

FERRO, E. A.; SILVA, D. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect Immunol.**, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002.

FITZGERALD, J. S.; POEHLMANN, T. G.; SCHLEUSSNER, E.; MARKERT, U. R. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3). **Hum Reprod Update.**, v. 14, n. 4, p. 335-344, 2008.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E. P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A. A.; SHENOY, A. S.; TERRAZAS, L. I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. R.; RODRIGUES-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.**, v. 22, n. 10. p. 3661- 3671, 2008.

FOROUTAN-RAD, M.; MAJIDIANI, H.; DALVAND, AHMADPOUR, E. Toxoplasmosis in blood donors: a systematic review and meta-analysis. **Transfus Med Rev.**, v. 30, n. 3., p. 116-122, 2016.

FRANCO, P. S.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, 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**, v. 32, n. 11, p. 838-844, 2011.

FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 181, p. 1-13, 2015.

FUJIGAKI, S.; SAITO, K.; TAKEMURA, M.; MAEKAWA, N.; YAMADA, Y.; WADA, H.; SEISHIMA, M. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. **Infect Immunol.**, v. 70, n. 2, p. 779-786, 2002.

FUNG, C.; BECK, J. R.; ROBERTSON, S. D.; GUBBELS, M. J.; BRADLEY, P. J. *Toxoplasma* ISP4 is a central IMC sub-compartment protein whose localization depends on palmitoylation but not myristoylation. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 184, n. 2, p. 99-108, 2012.

GALVÁN-RAMÍREZ, M. L.; JIMÉNEZ J. M. D.; PÉREZ, L. R. R.; TROYO-SANROMAN, R.; RAMÍREZ-HERRERA, M.; GARCÍA-IGLESIAS, T. Effect of nitaxozanide and pirymetamine on astrocytes infected by *Toxoplasma gondii* *in vitro*. **Arch Med Res.**, v. 44, n. 6, p. 415-421, 2013.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol.**, v. 32, n. 2, p. 167-70, 2002.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; DE OLIVEIRA, R. C.; E KOBILKA. Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jauguapitã (Paraná) Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 6, n. 3, p. 157-163, 1999.

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

GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU,

L. R.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol.**, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, 2011.

GONZÁLEZ, C.; MORENO, L.; FUMUSO, E.; GARCÍA, J.; RIVULGO, M.; CONFALONIERI, A.; SPARO, M.; SÁNCHEZ BRUNI, S. Enrofloxacin-based therapeutic strategy for the prevention of endometritis in susceptible mares. **J Vet Pharmacol Therap.**, v. 33, n. 3, p. 287-294, 2010.

GORFU, G.; CIRELLI, K. M.; MELO, M. B.; MAYER-BARBER, K.; CROWN, D.; KOLLER, B. H.; MASTERS, S.; SHER, A.; LEPPLA, S. H.; MOAYERI, M.; SAEIJ, J. P. J.; GRIGGA, M. E. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **J American Soc Microb.**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2014.

GOTTSTEIN, B.; RAZMI, G. R.; AMMANN, P.; SAGER, H.; MULLER, N. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. **Parasitology**, v. 130, n. pt1, p. 41-48, 2005.

GOVENDIR, M.; HANSEN, T.; KIMBLE, B.; NORRIS, J. M.; BARAL, R. M.; WIGNEY, D. I.; GOTTLIEB, S.; MALIK, R. Susceptibility of rapidly growing mycobacteria isolated from cats and dogs, to ciprofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin. **Vet Microbiol.**, v. 147, n. 1-2, p. 113-118, 2011.

GOYAL, P.; BRUNNERT, D.; EHRHARDT, J.; BREDOW, M.; PICCENINI, S.; ZYGMUNT, M. Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-phosphate receptor 2 involving Rho/Rho-kinase and Rac1 signaling pathways. **Mol Hum Reprod.**, v. 19, n. 8, p. 2013.

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

HABBIB, F. A.; Post-treatment assessment of acute *Toxoplasma* infection during pregnancy. **J Obstet Gynaecol.**, v. 28, n. 6, p. 593-595, 2008.

HABERKORN, A.; HARDER, A.; GREIF, G. Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and perspectives. **Parasitol Res.**, v. 39, n. 3, p. 1171-1175, 1996.

HABERKORN, A.; HARDER, A.; GREIF, G. Milestones of protozoan research at Bayer. **Parasitol Res.**, v. 87, n. 12, p. 1060-1062, 2001.

HARDING, C. R.; MEISSNER, M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*. **Cel Microbiol.**, v. 16, n. 5, p. 632-641, 2014.

HARIHARAN, H.; GIBSON, K.; PETERSON, R.; FRANKIE, M.; MATTHEW, V.; DANIELS, J.; MARTIN, N. A.; ANDREWS, L.; PATERSON, T.; SHARMA, R. N. *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from canine pyoderma cases in Grenada, West Indies, and their susceptibilities to beta-lactam drugs. **Vet Med Int.**, v. 1, n.1, p. 1-7, 2014.

- HARKER, K. S.; JIVAN, E.; MCWORTER, F. Y.; LIU, W. F.; LODOEN, M. B. Shear forces enhance *Toxoplasma gondii* tachyzoite motility on vascular endothelium. **MBio.**, v. 5, p. e01111-e01113, 2014.
- HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunol.**, v. 37, p. 141-149, 2015.
- HOU, B.; BENSON, A.; KUZMICH, L.; DE FRANCO, A. L.; YAROVINSKY, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 108, n. 1, p. 278-283, 2011.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effector. **Nat Rev Microbiol.**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2013.
- IQBAL, A.; TARIQ, K. A.; WAZIR, V. S.; SINGH, R. Antiparasitic efficacy of *Artemisia absinthium*, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. **J Parasitol Dis.**, v. 37, n. 1, p. 88-93, 2013.
- JIMENEZ-RUIZ, E.; MORLON-GUYOT, J.; DAHER, W.; MEISSNER, M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Mol Biochem Parasitol.**, in Press, 2016.
- 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. **Exp Parasitol.**, v. 121, n. 2, p. 132-136, 2009.
- JONES, J. L.; PARISE, M. E.; FIORE, A. E. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. **Am J Med Hyg.**, v. 90, n. 5, p. 794-799, 2014.
- JULLIAC, B.; THEOPHILE, H.; BEGORRE, M.; RICHEZ, B.; HARAMBURU, F. Side effects of spiramycin masqueradings as local anesthetic toxicity during labor epidural analgesia. **Int J Obstet Anesth.**, v. 19, n. 3, p. 331-332, 2010.
- KAMDA, J. D.; NASH, T. E.; SINGER, S. M. *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. **Exp Parasitol.**, v. 130, n. 3, p. 288-291, 2012.
- KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun.**, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.
- KEMP, L. E.; YAMAMOTO, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 37, n. 4, p. 607-631, 2013.
- KHAN, A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F.; REMINGTON, J. S. Activity of gatifloxacin alone or in combination with pyrimethamine or gamma interferon against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 45, n. 1, p. 48-51, 2001.

KHAN, A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F.; REMINGTON, J. S. Trovafloxacin is active against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 40, n. 8, p. 1855-1859, 1996.

KIEFFER, F.; WALLON, M. Congenital toxoplasmosis. **Handb Clin Neurol.**, v. 112, p. 1099-1101, 2013.

KIM, S.; COX, C. M.; JENKINS, M. C.; FETTERER, R. H.; MISKA, K. B.; DALLOUL, R. A. Both host and parasite MIF molecules bind to chicken macrophages via CD74 surface receptor. **Dev Comp Immunol.**, v. 47, n. 2, p. 319-326, 2002.

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

KOBLANSKY, A. A.; JANKOVIC, D.; OH, H.; HIENY, S.; SUNGNAK, W.; MATHUR, R.; HAYDEN, M. S.; AKIRA, S.; SHER, A.; GHOSH, S. Recognition of profiling by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 119-130, 2013.

KRITZNER, S.; SAGER, H.; BLUM, J.; KREBBER, R.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 1, p. 1-10, 2002.

KUL, O.; YILDIZ, K.; OCAL, N.; FREYRE, A.; DENIZ, A.; KARAHAN, S.; ATMACA, H. T.; GOKPINAR, S.; DINCEL, G. C.; UZUNALIOGLU, T.; TERZI, O. S. In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. **Res Vet Sci.**, v. 94, n. 2, p. 269-276, 2013.

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

LARSEN, H.; NIELSEN, G. L.; SCHONHEYDER, H. C.; OLESEN, C.; SORENSEN, H. T. Birth outcome following maternal use of fluoroquinolones. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 18, n. 3, p. 259-262, 2001.

LI, X-L.; WEI, H-X.; ZHANG, H.; PENG, H-J.; LINDSAY, D. S. A meta analysis on risk of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. **PloS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97775, 2014.

LOPES, C. D.; SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V.; SOUSA, R. A.; FIRMINO, M. L.; BERNARDES, E. S.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; PENA, J. D. O. Azithromycin reduces ocular infection during congenital transmission of toxoplasmosis in the *Calomys callosus* model. **J Parasitol.**, v. 95, n. 4, p. 1005-1010, 2009.

MAENZ, M.; SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Prog Retinal Eye Res.**, v. 39, p. 77-106, 2014.

MARTINS-DUARTE, E. S.; DUBAR, F.; LAWTON, P.; SILVA, C. F.; SOEIRO, M. N.; SOUZA, W.; BIOT, C.; VOMMARO, R. C. Ciprofloxacin derivatives affect parasite cell

division and increase the survival of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125705, 2015.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D. C.; SAEJI, J. P. J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011.

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. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 1269-1277, 2008.

MILLER, R. K.; GENBACEV, O.; TURNER, M. A.; APLIN, J. D.; CANIGGIA, I.; HUPPERTZ, B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. **Placenta**, v. 26, n. 6, p. 439-448, 2005.

MIRPURI, J.; YAROVINSKY, F. IL-6 signaling SOCS critical for IL-12 host response to *Toxoplasma gondii*. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 13-16, 2012.

MITCHELL, S. M.; ZAJAC, A. M.; DAWIS, W. L.; LINDSDAY, D. S. Efficacy of ponazuril in vitro and treating *Toxoplasma gondii* infections in mice. **J Parasitol.**, v. 90, n. 3, p. 639-642, 2004.

MONTAZERI, M.; DARYANI, A.; EBRAHIMZADEH, M.; AHMADPOUR, E.; SHARIF, M.; SARVI, S. Effect of propranolol alone and in combination with pyrimethamine on acute murine toxoplasmosis. **Jundishapur J Microbiol.**, v. 8, n. 9, p. 1-5, 2015.

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

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis.**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, v. 65, n. 1-2, 1983.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESA, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev.**, v. 240, n. 1, p. 269-285, 2011.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, v. 4, p. 233-242, 2002.

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

OLARIU, T. R.; REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; ALAM, A.; MONTOYA, J. G. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 30, n. 12, p. 1056-1061, 2011.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A. D.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of

Toxoplasma gondii, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 691-698, 2006.

OLSEN, J.; JÖRKLUND, B.; KROGH, K. A.; HANSEN, M. Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil and animal manure. **Anal Chim Acta.**, v. 755, p. 69-76, 2012.

OLIVEIRA, T. C.; SILVA, D. A. O.; ROSTKOWSKA, C.; BÉLA, S. R.; FERRO, E. A. V.; MAGALHÃES, P. M.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. **Exp Parasitol.**, v. 122, n. 3, p. 233-241, 2009.

ONG, Y. C.; REESE, M. L.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host functions by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. **J Bio Chem.**, v. 285, n. 37, p. 28731-28740, 2010.

OPITZ, C.; SOLDATI, D. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 597-604, 2002.

OZ, H. S. Novel synergistic protective efficacy of atovaquone and diclazuril on fetal-maternal toxoplasmosis. **Int J Clin Med.**, v. 5, n. 15, p. 921-932, 2014a.

OZ, H. S. Toxoplasmosis complications and novel therapeutic synergism combination of diclazuril plus atovaquone. **Front Microbiol.**, v. 5, p. 1-9, 2014b.

OZ, H. S.; TOBIN, T. Diclazuril protects against maternal gastrointestinal syndrome and congenital toxoplasmosis. **Int. J. Clin. Med.**, v. 5, n. 3, p. 93-101, 2014.

PALLO-ZIMMERMAN, L. M.; BYRON, J. K.; GRAVES, T. K. Fluoroquinolones: then and now. **Compend Contin Educ Vet.**, v. 32, n. 7, p. 1-9, 2010.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol.**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, 2009.

PASSOS, S. T.; SILVER, J. S.; O'HARA, A. C.; SEHY, D.; STUMHOFFER, J. S.; HUNTER, C. A. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. **J Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1776-1783, 2010.

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

PHILIPPE, P.; ALZIEU, J. P.; TAYLOR, M. A.; DORCHIES, PH. Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan) and toltrazuril (Baycox bovis) against natural infections of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in French calves. **Vet Parasitol.**, v. 206, n. 3-4, p. 129-137, 2014.

PLATTNER, F.; YAROVINSKY, F.; ROMERO, S.; DIDRY, D.; CARLIER, M. F.; SHER, A.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host Microbe.**, v. 3, n. 2, p. 77-87, 2008.

PORTELA, R. W.; BETHONY, J.; COSTA, M. I.; GAZZINELLI, A.; VITOR, R. W.; HERMETO, F. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, R. T. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipidspecific immunoglobulin A. **J Infect Dis.**, v. 190, n. 1, p. 175-183, 2004.

PRINS, J. R.; GOMEZ-LOPEZ, N.; ROBERTSON, S. A. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. **J Reprod Immunol.**, v. 95, n. 1-2, 2012.

PREVIATO, M.; FREDERICO, F. B.; MURATA, F. H. A.; SIQUEIRA, R. C.; BARBOSA, A. P.; SILVERIA-CARVALHO, A. P.; MEIRA, C. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; GAVA, R.; NETO, P. P. M.; MATTOS, L. C.; MATTO, C. C. B. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 1-8, 2015.

QIAN, W.; WANG, H.; SHAN, D.; LI, B.; LIU, J.; LIU, Q. Activity of several kinds of drugs against *Neospora caninum*. **Parasitol Int.**, v. 64, n. 6, p. 597-602, 2015.

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

RICO-TORRES, C. P.; VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; CORREA, D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 35, n. 7, p. 1079-1088, 2016.

ROBBINS, J. R.; BAKARDJIEV, A. I. Pathogens and the placental fortress. **Curr Opin Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 36-43, 2012a.

ROBBINS, J. R.; ZELDOVICH, V. B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J. C.; BAKARDJIEV, A. I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, v. 80, n. 1, p. 418-428, 2012b.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **J Infect.**, v. 68, p. 125-133, 2014.

RODRIGUES, I. M.; COSTA, T. L.; AVELAR, J. B.; AMARAL, W. N.; CASTRO, A. M.; AVELINO, M. M. Assessment of laboratory methods used in the diagnosis of congenital toxoplasmosis after maternal treatment with spiramycin in pregnancy. **BMC Infec Dis.**, v. 14, p. 1-9, 2014.

SA, Q.; WOODWARD, J.; ZUZUKI, Y. IL-2 produced by CD8⁺ immune T cells can augment their IFN- γ production independently from their proliferation in the secondary response to intracellular pathogen. **J Immunol.**, v. 190, n. 5, p. 2199-2207, 2013.

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; COLLIER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L. D.; BROOKE-POWELL, E. T.; AJIOKA, J. W.; BOOTHROYD, J. C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1780-1783, 2006.

- SANECKA, A.; FRICKEL, E. A. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 678-689, 2014.
- SATOSKAR, A. R.; BOZZA, M.; RODRIGUES SOSA, M.; LIN, G.; DAVID, J. R. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. **Infect Immun.**, v. 69, n. 2, p. 906-911, 2001.
- SERRANTI, D.; BUONSENSO, D.; VALENTINI, P. Congenital toxoplasmosis treatment. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 15, n. 2, p. 193-198, 2011.
- SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 46, n. 2, p. 141-146, 2016.
- SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014.
- SLOVES, P. J.; MOUVEAUX, T.; AITA-YAHIA, S.; VORNG, H.; EVERAERE, L.; SANGARE, L. O.; TSICOPOULOS, A.; TOMAVO, S. Apical organelle secretion by *Toxoplasma gondii* controls innate and adaptive immunity and mediates long-term protection. **J Infect Dis.**, v. 212, n. 9, p. 1449-1458, 2015.
- SOLDATI-FAVRE, D. Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 197-205, 2008.
- SOMMERVILLE, C.; RICHARDSON, J. M.; WILLIAMS, R. A. M.; MOTTRAM, J. C.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J.; HENRIQUEZ, F. L. Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 18, p. 12733-12741, 2013.
- SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- SRÉTER, T.; SZÉLL, Z.; VARGA, I. Anticryptosporidial prophylactic efficacy of enrofloxacin and paromomycin in chickens. **J Parasitol.**, v. 88, n. 1, p. 209-211, 2002.
- SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**. v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.
- STROHBUSCH, M.; MULLER, N.; HEMPHILL, A.; KREBBER, R.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. **Parasitol Res.**, v. 104, n. 6, p. 1335-1343, 2009.
- TERRAZAS, C. A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L. I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E. A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory

response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Exp Parasitol.**, v. 126, n. 3, p. 348-358, 2010.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; BESNÉ-MÉRIDA, A.; CORREA, D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Vet Parasitol.**, v. 223, p. 195-204, 2016.

VELICKY, P.; KNOFLER, M.; POLLHEIMER, J. Functional and control of human invasive trophoblast subtypes: intrinsic vs. maternal control. **Cell Adhesion Migration**, v. 10, n. 1-2, p. 154-162, 2016.

VERMA, S.; HIBY, S. E.; LOKE, Y. W.; KING, A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biol Reprod.**, v. 62, n. 4, p. 959-968, 2000.

VILLENA, I.; AUBERT, D.; LEROUX, B.; DUPOUY, D.; TALMUD, M.; CHEMLA, C.; TRENQUE, T.; SCHMIT, G.; QUEREUX, C.; GUENOUNOU, M.; PLUOT, M.; BONHOMME, A.; PINON, J. M. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. **Scand J Infect Dis.**, v. 30, n. 3, p. 295-300, 1998.

VOSENKÄMPER, A.; STRUCK, D.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; WENT, T.; TAKEDA, K.; AKIRA S, PFEFFER K, ALBER G, LOCHNER M, FÖRSTER I, LIESENFELD O. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. **Eur J Immunol.**, v. 34, n. 11, p. 3197-3207, 2004.

WILLMOTT, C. J.; CRITCHLOW, S. E.; EPERON, I. C.; MAXWELL, A. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. **J Mol Biol.**, v. 242, n. 4, p. 351-363, 1994.

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strains hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiol.**, v. 213, n. 4, p. 828-845, 2015.

YAN, C.; LIANG, L.; ZHENG, K.; ZHU, X. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasite & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016.

YAROVINSKY F. Toll-like receptors and their role in host cell resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol Lett.**, v. 119, n.1-2, p. 255-259, 2008.

ZHOU, W.; QUAN, J.; LEE, Y.; SHIN, D.; CHA, G. *Toxoplasma gondii* proliferation require down-modulation of host Nox4 expression via activation of PI3/kinase/Akt signaling pathway. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p.e66306, 2013.

ANEXOS

Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –
Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;
e-mail: cep@propp.ufu.br ; www.comissoes.propp.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS COMUNICA QUE AS PESQUISAS CUJOS DADOS SERÃO OBTIDOS EXCLUSIVAMENTE COM O USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE NÃO NECESSITAM DE ANÁLISE ÉTICA POR UM CEP.

EXEMPLOS DESSAS CÉLULAS: HeLa; BeWo; JEG-3; HTR-8; HFF; Caco-2.

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de enrofloxacin e toltrazuril na susceptibilidade de células trofoblásticas humanas e vilos placentários humanos a termo frente a infecção por *Toxoplasma gondii*

Pesquisador: Bellisa de Freitas Barbosa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52671516.2.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.585.342

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

O presente projeto de pesquisa tem como modelos experimentais a utilização de células BeWo adquiridas comercialmente pelo ATCC e vilos placentários humanos a termo. Com este propósito, o desenho experimental se realizará da seguinte forma: células da linhagem BeWo previamente congeladas no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução serão mantidas em cultura normalmente, enquanto que vilos placentários humanos serão obtidos a partir da coleta de placentas provenientes de gestantes parturientes do Hospital de Clínicas da UFU. Pacientes gestantes, parturientes, sorologicamente saudáveis e atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) (N=10) serão informadas sobre os objetivos do trabalho. Após a autorização materna, comprovada pela assinatura do termo de consentimento (TCLE), placentas a termo (36-40 semanas de gestação) serão obtidas destas parturientes, exclusivamente provenientes de cesáreas, para dissecação de vilos placentários. As placentas apenas serão coletadas de pacientes que não apresentarem pré-eclampsia, hipertensão coriônica, doenças infecciosas incluindo toxoplasmose, doenças cardíacas, diabetes e outras manifestações clínicas que possam interferir nos resultados. Após a coleta das

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.585.342

mesmas, as placentas serão levadas até o Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da UFU e imediatamente lavada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril para a remoção do excesso de sangue, seguido da dissecação com o auxílio de um esteriomicroscópio para remover o tecido endometrial e a membrana fetal. Vilos placentários terminais flutuantes serão coletados a partir das placentas e posteriormente

colocados em placas de 96 poços (um por poço) e cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina durante 24 horas à 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, células BeWo e vilos placentários humanos a

termo serão infectados por *Toxoplasma gondii* (cepas virulenta e avirulenta) e tratados com diferentes concentrações dos antibióticos enrofloxacin, tolfazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina. Mediante infecção e tratamento, as células BeWo e os vilos serão analisados para citotoxicidade, proliferação intracelular de *T. gondii*, morfologia e produção de citocinas. Estas análises serão realizadas para demonstrar o efeitos destes medicamentos nas células BeWo e nos vilos placentários humanos a termo.

Critério de Inclusão:

As placentas apenas serão coletadas de pacientes que não apresentarem pré-eclampsia, hipertensão coriônica, doenças infecciosas incluindo toxoplasmose, doenças cardíacas, diabetes e outras manifestações clínicas que possam interferir nos resultados. Após a autorização materna, comprovada pela assinatura do termo de consentimento, placentas a termo (36-40 semanas de gestação) serão obtidas destas parturientes, exclusivamente provenientes de cesárias, para dissecação de vilos placentários.

Critério de Exclusão:

Não se aplica. As parturientes não serão acompanhadas durante a gestação e as placentas serão coletadas apenas de pacientes sorologicamente saudáveis (negativas para Toxoplasmose e outras infecções) no momento do parto e após análise do prontuário. O único contato com a parturiente será no momento do parto para a coleta da placenta.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo a avaliação do efeito de enrofloxacin e tolfazuril na

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.585.342

susceptibilidade de células BeWo e explantes de vilos placentários humanos a termo frente à infecção por *T. gondii*.

Objetivo Secundário:

- Avaliar o efeito de enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina (ASP) na citotoxicidade (viabilidade celular) de células trofoblásticas BeWo e na toxicidade de explantes de vilos humanos a termo.
- Avaliar o efeito de enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina (ASP) na proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilos de placenta a termo e em células trofoblásticas BeWo infectadas por cepas virulentas (RH -2F1) e avirulentas (ME49) de *T. gondii*.
- Avaliar o efeito de enrofloxacin, toltrazuril, sulfadiazina, pirimetamina ou associação de sulfadiazina e pirimetamina (ASP) na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em explantes de vilos de placenta a termo e em células trofoblásticas BeWo infectadas por *T. gondii* (cepas 2F1 e ME49).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

A utilização de placentas humanas a termo neste estudo não oferece risco à saúde da paciente, médicos envolvidos no parto, enfermeiros e ao pesquisador que irá manuseá-las, uma vez que a placenta humana será normalmente expulsa pelo organismo materno após o parto. Toda a equipe hospitalar que realizará o parto da gestante faz uso de técnicas de biossegurança, e também o pesquisador que irá manipular a placenta no laboratório fará uso de equipamentos e vestimentas de segurança, como jaleco, luvas, máscara, óculos e fluxo laminar. Portanto, nenhum risco à saúde haverá para os participantes do projeto, equipe hospitalar e a paciente. No entanto, sempre há um risco mínimo de identificação dos sujeitos da pesquisa, ou seja, as pacientes parturientes. Este risco mínimo de identificação pessoal será claramente descrito no TCLE, embora a identidade das pacientes será preservada. A equipe executora se compromete com o sigilo absoluto da sua identidade, pois os dados publicados só serão referentes à biologia e ao processo de invasão de *T. gondii* nos vilos placentários.

Benefícios:

Os benefícios da presente proposta são significantes, pois os resultados obtidos poderão

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

Continuação do Parecer: 1.585.342

proporcionar o estabelecimento de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento da toxoplasmose congênita, reduzindo as taxas de transmissão vertical do parasito e, conseqüentemente, as taxas de aborto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância científica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam os termos obrigatórios de forma adequada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam as pendências.

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

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: dezembro de 2017.

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

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo Participante da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O Participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.585.342

Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante da pesquisa ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_627522.pdf	18/05/2016 13:11:37		Aceito
Outros	RespostaPendenciasMaio.pdf	18/05/2016 13:10:35	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Outros	curriculumlattespesquisadores.pdf	22/01/2016 14:29:30	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Outros	modelodeinstrumentodecoleta.pdf	22/01/2016 14:28:55	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	22/01/2016 14:28:09	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	22/01/2016 14:27:16	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinstituicaocoparticipante.pdf	15/01/2016 15:41:25	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.585.342

Declaração de Pesquisadores	equipeexecutora.pdf	15/01/2016 15:40:46	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	15/01/2016 15:40:25	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 09 de Junho de 2016

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

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