



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas**

**Susceptibilidade diferencial de células trofoblásticas
humanas (BeWo) e cervicais uterinas (HeLa) à
infecção por *Neospora caninum***

Julianne Vargas de Carvalho

Uberlândia

Fevereiro – 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas**

**Susceptibilidade diferencial de células trofoblásticas
humanas (BeWo) e cervicais uterinas (HeLa) à
infecção por *Neospora caninum***

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

Julianne Vargas de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia

Fevereiro – 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- C331s Carvalho, Julianne Vargas de, 1978-
Susceptibilidade diferencial de células trofoblásticas humanas (BeWo) e cervicais uterinas (HeLa) à infecção por *Neospora caninum* [manuscrito] / Julianne Vargas de Carvalho. - 2010.
75 f. : il.
Orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.
Co-orientador: José Roberto Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Neosporose - Teses. 2. Neospora - Teses. I. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 619:616.993.1



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



Julianne Vargas de Carvalho

“Susceptibilidade diferencial de células trofoblásticas humanas (BeWo) e cervicais uterinas (HeLa) à infecção por *Neospora caninum*”

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, 25 de fevereiro de 2010.

Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira – UFU/Campus Pontal

Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro – ICBIM/UFU

Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva – ICBIM/UFU

Dedico esta conquista...

*...ao Meu Pai Maior
(arquiteto do Universo)
que me concedeu a vida e
iluminou as minhas escolhas...*

*... aos meus pais biológicos,
cujo amor e dedicação
possibilitaram minha
formação pessoal
e profissional...*

*e aos meus pais científicos
(Dra. Deise e Dr. Mineo)
que me acolheram com carinho e
me proporcionaram sabedoria...*

*“Embora ninguém possa voltar atrás
e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora
e fazer um novo fim.”*

(Chico Xavier)

*“Os ventos que às vezes tiram algo que amamos,
são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar...
Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim,
aprender a amar o que nos foi dado.
Pois tudo aquilo que é realmente nosso,
nunca se vai para sempre.”*

(Bob Marley)

Agradecimentos especiais

À minha mãe Eliete, à minha vó Leticia e ao meu pai Aldo que estiveram do meu lado em mais esta etapa me proporcionando amor e dedicação, por acreditar em mim e pelos esforços constantes para a realização desta conquista...

À professora Dra. Deise Ap. Cliveira Silva por ter me orientado, pela sua competência, sabedoria, paciência, carinho, amizade, por ter me acolhido como uma filha no laboratório e também em sua casa... Enfim, por ser tão especial e por estar ao meu lado nos momentos que mais precisei... Tive muito orgulho e satisfação por tê-la como orientadora oficial, pois é admirada por todos...

Os conhecimentos adquiridos durante todo o Mestrado têm imensa participação sua...

Obrigada por ter entrado na minha história e agora fazer parte da minha vida...

Ao Professor Dr. José Roberto Minea, muito obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório nos oferecendo toda a infra-estrutura para a realização da parte experimental deste trabalho e por compartilhar do seu conhecimento durante o pouco, mas muito precioso tempo que estive do seu lado, sei que foi muito importante para a minha vida profissional. Espero que este laço de amizade e profissionalismo que criamos não pare por aqui, siga adiante com novas conquistas.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e em especial a:

DEUS que me proporcionou o direito de estar aqui, ensinou-me a amar e respeitar ao próximo e que colocou no meu caminho todos esses colegas de trabalho, amigos e familiares dos quais amo muito;

Minha família que é tudo de mais sagrado que tenho em minha vida: minha mãe (Eliete), meu pai (Aldo) e minha avó (Leticia) que me ensinaram e mostraram o caminho certo a seguir, desde os primeiros passos até hoje. Com dedicação e superação conseguiram me colocar na situação de mestranda. Eles proporcionaram muito amor a mim e ao Gustavo, cuidaram dele com muito carinho para que eu pudesse realizar este trabalho;

Também agradeço à minha bisavó (Waldomira)- 95 anos- que torce por mim e fica muito feliz a cada conquista; ao meu irmão (Anderson) que mesmo distante se faz presente em meu coração; ao meu filho (Gustavo) –cresci, enquanto tu também crescestes- por estar ao meu lado me proporcionando momentos de alegria e amor. Muito obrigado a todos os meus familiares pelo apoio, incentivo e estímulo que me deram durante toda a minha vida, não serão essas palavras que irão representar toda a minha gratidão, porque por tudo que fizestes até hoje palavras nenhuma conseguirão representar, por isso muito obrigado por simplesmente existirem na minha vida;

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas que colaboraram para minha formação acadêmica, e especialmente...

À Profa. Dra. Deise que me orientou e agradeço novamente tudo o que fez por mim e pelos agradáveis anos de convívio e amizade;

Ao Prof. Dr. Mineo pela co-orientação e por me acolher no Laboratório e por permitir que o trabalho fosse realizado;

Aos Profs. Dr. Tiago, Dr. Jair, Dr. Cláudio, pelas idéias e sugestões no trabalho, também pelo carinho e amizade;

Ao prof. Dr. Ernesto, pela atenção, amizade e por ter emprestado alguns equipamentos necessários para a realização do presente trabalho;

À profa. Dra. Neide pelas sugestões no trabalho, por ter emprestado os reagentes para os ensaios de inibição da enzima IDO e pela atenção;

À profa. Dra. Eloísa por trazer para o Laboratório a linhagem BeWo que foi essencial na realização do trabalho, também por ter aceito o convite para a banca e pela e atenção e carinho;

Aos técnicos do laboratório: Edilge, Marley e Zilda pelo suporte técnico, pela lavagem e esterilização dos materiais, pela preparação dos meios de cultura e por todo carinho e amizade que proporcionaram a mim;

Aos secretários Max, Lucileide e Lucélia pela prontidão para nos atender, pela bondade e educação;

Às amigas que fazem parte do projeto: Celene, Mariana, Caroline e Bellisa que me ajudaram imensamente e que estavam dispostas a colaborar a qualquer hora do dia. Meninas, agradeço toda o amor e dedicação... Sei que sempre poderei contar com vocês e saiba que a recíproca também é verdadeira, obrigada;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunoparasitologia: Cristina, Ana Cláudia, Álvaro, Hercílio, Celene, Fernanda (pós-doc), Luciana, Mariana Damas, Silas, Caroline, Mariana (Vet), Marcus, Leticia, Gabriela, Fernanda Pantaleão, Everton, Pollyana, Fabiane, Flávia, Maraisa, Faísa, Murilo, Willian, Arlindo... Muito obrigado pelo amor, carinho, amizade e pelos momentos alegres que passamos juntos. Amo todos vocês;

Aos amigos que não estão mais no Laboratório: Dâmaso, Priscilla Buiatti e Pablo, fico grata por toda a ajuda no começo dos meus experimentos;

À todas os colegas da Histologia: Angélica, Bellisa, Priscila, Andressa, Rosiane, Mariana, Ester, Loyane, Juliana (Vet), Marcelo e Mariani pela amizade e companheirismo;

Aos colegas e amigos da Alergia: Juliana, Karine, Leandro, Isabella, Laura, Daniela, Ana Carolina, Jorge, Priscila e Diego, e especialmente à Bia, obrigada pela amizade e carinho;

Às colegas do Laboratório de Biologia Molecular (6T): Adele e Lillian...Obrigada pelo carinho e atenção;

À todos os amigos, colegas e professores da Microbiologia e Parasitologia, obrigada pela amizade e carinho;

À Daniele Reis e ao Prof. Fábio da Biofísica que concederam equipamentos necessários para a realização dos experimentos de LDH;

À CAPES, FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho;

Enfim, por todos que diretamente e indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho...

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	<i>Neospora caninum</i> e hospedeiros intermediários e definitivos	14
1.2	Ciclo biológico e vias de transmissão de <i>Neospora caninum</i>	15
1.3	Patogênese da neosporose	17
1.4	Resposta imune a <i>Neospora caninum</i>	18
1.5	Células trofoblásticas	20
1.6	Linhagem de células BeWo	21
1.7	Resposta imune na gestação	22
1.8	Células trofoblásticas e infecções placentárias	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Cultura de células BeWo e HeLa	29
4.2	Manutenção e obtenção de taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>	29
4.3	Preparação de antígeno de <i>Neospora caninum</i>	30
4.4	Infecção de células BeWo e HeLa por <i>Neospora caninum</i>	31
4.4.1	Ensaio de MTT	31
4.4.2	Análise da liberação de lactato desidrogenase (LDH)	32
4.5	Pré-tratamento de células BeWo e HeLa e infecção por <i>Neospora caninum</i>	32
4.5.1	Determinação de citocinas	33
4.5.2	Determinação nitrito	34

4.6 Análises de infecção e replicação de <i>Neospora caninum</i> em células hospedeiras	34
4.7 Ensaio de inibição da atividade de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO)	35
4.8 Análise estatística.....	36
4.9 Normas de biossegurança	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Viabilidade celular após infecção por <i>Neospora caninum</i>	37
5.2 Lise celular após infecção por <i>Neospora caninum</i>	40
5.3 Produção de citocinas por células BeWo e HeLa após infecção por taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>	43
5.4 Infecção e replicação intracelular de <i>Neospora caninum</i> em células BeWo e HeLa.....	46
5.5 Efeito do pré-tratamento de células HeLa com IFN- γ e inibidor da enzima IDO ou suplementação com L-triptofano sobre a replicação intracelular de <i>Neospora caninum</i>	48
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A	75

Resumo

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório, estreitamente relacionado com *Toxoplasma gondii*, e considerado uma das principais causas de aborto e neosporose congênita em bovinos em todo o mundo. Como células trofoblásticas agem nos mecanismos de defesa imunológica inata na interface materno-fetal, e não há dados disponíveis sobre a interação deste parasito com o trofoblasto humano, este estudo teve como objetivo verificar a susceptibilidade das linhagens de células trofoblásticas humanas (BeWo), comparado às linhagens cervicais uterinas (HeLa), à infecção por *Neospora caninum*. Células BeWo e HeLa foram infectadas com diferentes proporções (parasito:célula) de taquizoítos de *Neospora caninum* e analisadas em diferentes tempos após a infecção quanto à viabilidade celular, utilizando a análise colorimétrica do tetrazólio de metiltiazol (MTT), e lise celular, por meio da mensuração de lactato desidrogenase (LDH). Ambas as linhagens celulares também foram avaliadas quanto à produção de citocinas e índices de infecção e replicação intracelular parasitária quando pré-tratadas ou não com o antígeno lisado de *Neospora* (NLA) ou interferon-gama (IFN- γ) recombinante humano. Foi observado que *Neospora caninum* induziu um aumento na viabilidade celular em ambas as linhagens, principalmente em células BeWo nas primeiras horas de infecção, sugerindo que a infecção pelo parasito poderia ser capaz de inibir precocemente a morte celular e/ou induzir a proliferação celular. A infecção por *Neospora caninum* induziu produção aumentada do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF), principalmente em células HeLa, que foi ainda maior com o pré-tratamento das células com NLA ou IFN- γ . Inversamente, a infecção parasitária diminuiu a produção do fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β), principalmente em células BeWo, que foi ainda menor quando as células foram pré-tratadas com NLA ou IFN- γ . Células HeLa foram mais susceptíveis à infecção por *Neospora caninum* que células BeWo e o pré-tratamento com IFN- γ resultou em significativo decréscimo na porcentagem de células infectadas em ambas as linhagens celulares, sendo que o controle do crescimento parasitário foi mediado por IFN- γ através de mecanismo dependente da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) somente em células HeLa. Em conclusão, este estudo demonstrou pela primeira vez que células BeWo e HeLa são alvos potenciais como células hospedeiras para *Neospora caninum*, embora apresentando diferenças na susceptibilidade à infecção, produção de citocinas e viabilidade celular, refletindo em estratégias utilizadas pelo parasito para sobrevivência dentro das células hospedeiras.

Palavras-chave: *Neospora caninum*. Trofoblasto humano. Células BeWo. Células HeLa. Citocinas.

Abstract

Neospora caninum is an obligate intracellular parasite, closely related to *Toxoplasma gondii*, and considered a major cause of abortion and congenital neosporosis in cattle worldwide. As trophoblast cells act in mechanisms of innate immune defense at fetal-maternal interface, and no data are available about the interaction of this parasite with human trophoblasts, this study aimed to verify the susceptibility of human trophoblastic (BeWo) compared to uterine cervical (HeLa) cell lines to *Neospora caninum* infection. BeWo and HeLa cells were infected with different parasite:cell ratios of *Neospora caninum* tachyzoites and analyzed in different times after infection for cell viability using the colorimetric assay of thiazolyl blue tetrazole (MTT) and cell lysis by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) activity. Both cell lines were also evaluated for cytokine production and parasite infection/replication assays when pretreated or not with *Neospora* lysate antigen (NLA) or human recombinant interferon-gamma (IFN- γ). It was found that *Neospora caninum* induced increased cell viability in both cell lines, more evidently in BeWo cells, in the first hours of infection, suggesting that parasite infection could be able to early inhibit cell death and/or to induce cell proliferation. Also, *Neospora caninum* infection induced upregulation of the macrophage migration inhibitory factor (MIF), mostly in HeLa cells, which was improved with cell pretreatment with NLA or IFN- γ . Conversely, parasite infection induced downregulation of the transforming growth factor (TGF- β), mostly in BeWo cells, which was more decreased with NLA or IFN- γ pretreatment. HeLa cells were more susceptible to *Neospora caninum* infection than BeWo cells, and IFN- γ pretreatment resulted in significant decrease in the percentage of infected cells in both cell lines, and the control of the parasite growth was mediated by IFN- γ through an indoleamine-2,3- dioxygenase (IDO)-dependent mechanism in HeLa cells only. In conclusion, this study demonstrated for the first time that BeWo and HeLa cells are potential targets as host cells for *Neospora caninum*, although presenting differences in susceptibility to infection, cytokine production and cell viability, reflecting in strategies used by the parasite for survival inside the host cells.

Keywords: *Neospora caninum*. Human trophoblasts. BeWo cells. HeLa cells. Cytokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum* e hospedeiros intermediários e definitivos

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia e família Sarcocystidae (ELLIS et al., 1994). Estruturalmente, *N. caninum* é semelhante ao protozoário *Toxoplasma gondii*, embora apresente diferenças antigênicas e biológicas, sendo capaz de infectar com êxito uma grande variedade de tipos celulares *in vitro* (HEMPHILL et al., 1999; DUBEY, 2003).

Na última década, *N. caninum* tem sido extensivamente estudado por causar doença neuromuscular em cães e aborto em bovinos em várias partes do mundo, incluindo o Brasil (DUBEY, 2005; MINERVINO et al., 2008), resultando em grandes perdas econômicas na pecuária de corte e de leite (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

O primeiro relato do parasito ocorreu em 1984 na Noruega, associado a desordens neurológicas em filhotes de cães de uma mesma ninhada. A infecção foi causada por um coccídeo formador de cistos, morfológicamente semelhante a *T. gondii*, mas os cães apresentavam sorologia negativa a este parasito (BJËRKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984).

A descrição do gênero e espécie *Neospora caninum* foi feita por Dubey e colaboradores (1988a) em filhotes de cães que apresentavam sinais clínicos similares aos descritos em 1984 por Bjerkas (BJËRKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). No mesmo ano, Dubey e colaboradores (1988b) isolaram *N. caninum* em cultura de células, a partir de cistos teciduais de cães que apresentavam alterações neurológicas (isolado NC-1) e, mais tarde, foi também identificado em bovinos como causa de aborto (THILSTED; DUBEY, 1989). Posteriormente, outra espécie, *Neospora hughesi* foi proposta para o parasito isolado de eqüinos, com base em diferenças antigênicas e moleculares (MARSH et al., 1998).

Infecções naturais por *N. caninum* já foram demonstradas em ampla faixa de hospedeiros intermediários, incluindo animais domésticos e silvestres, tais como: cães, gatos, porcos, carneiros, cabras, cavalos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados e camelos (DUBEY et al., 2002; PINHEIRO et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que aves da espécie *Gallus domesticus* podem ser

hospedeiros intermediários naturais do parasito (COSTA et al., 2008). O encontro de oocistos de *N. caninum* nas fezes de canídeos alimentados com cistos teciduais de camundongos experimentalmente infectados com esse parasito possibilitou determinar os cães (McALLISTER et al., 1998) e coiotes (GONDIM et al., 2004) como seus hospedeiros definitivos.

Infecções experimentais com *N. caninum* foram realizadas com êxito em bovinos, carneiros, cabras, porcos, cães, gatos, camundongos, gerbis e pombos (DUBEY et al., 2002). Em primatas não-humanos, o parasito causou infecção fetal quando experimentalmente inoculado em fêmeas prenhes, com lesões muito semelhantes àsquelas encontradas na toxoplasmose congênita (BARR et al., 1994). Desta forma, os humanos poderiam ser hospedeiros acidentais de *N. caninum*, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Embora não haja relatos comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999), evidências sorológicas de exposição ao parasito foram demonstradas em diferentes populações humanas (NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999). Mais recentemente, um estudo do nosso grupo demonstrou maior soropositividade a *N. caninum* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com desordens neurológicas quando comparado a indivíduos saudáveis, aludindo novas questões sobre o papel de *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos (LOBATO et al., 2006).

1.2 Ciclo biológico e vias de transmissão de *Neospora caninum*

N. caninum apresenta ciclo de vida heteroxeno típico de parasitos do filo Apicomplexa, alternando entre hospedeiros definitivos, nos quais ocorre reprodução sexuada e eliminação de oocistos, e hospedeiros intermediários, nos quais ocorre reprodução assexuada e formação de cistos teciduais (DUBEY, 1999).

As formas infectantes do parasito são taquizoítos (livres ou em vacúolos parasitóforos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (dentro de oocistos). Após a ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários, esporozoítos são liberados no trato gastrointestinal, penetram nas células epiteliais e transformam-se em taquizoítos que se multiplicam rapidamente por endodiogenia

levando à formação de pseudocistos, os quais se rompem e liberam taquizoítos infectantes, disseminando a infecção para vários tecidos (DUBEY, 2005). Os taquizoítos causam forte resposta inflamatória com destruição tecidual e são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (fase aguda). Quando a resposta imune específica é desencadeada, taquizoítos se transformam em bradizoítos, iniciando a segunda fase de desenvolvimento assexuado do parasito. Bradizoítos multiplicam-se lentamente por endodiogenia e formam os cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais e musculares, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica) (DUBEY, 2003).

Quando ingeridos por hospedeiros definitivos, a parede dos cistos é digerida por enzimas proteolíticas, liberando bradizoítos que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia) com formação de esquizontes e liberação de merozoítas, os quais iniciam a fase sexuada (gamogonia) com a produção final de oocistos não-esporulados que são eliminados com as fezes. No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia entre 1 e 5 dias, com a formação de oocistos esporulados que podem permanecer viáveis no solo por longo tempo (DUBEY, 2003).

A infecção por *N. caninum* pode ocorrer por transmissão vertical (transplacentária) ou horizontal (oral) em vários hospedeiros, sendo a transmissão vertical mais importante entre bovinos. A transmissão vertical ocorre pela passagem transplacentária de taquizoítos de mães infectadas para os fetos, provocando aborto ou infecção congênita, dependendo do estágio da gestação quando a mãe é infectada (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). O parasito pode ser transmitido de mães infectadas para o feto durante sucessivas gestações, contribuindo significativamente para a persistência da infecção no rebanho. Desta forma, duas formas de transmissão transplacentária são caracterizadas: (1) *infecção transplacentária endógena*, na qual o feto pode ser infectado como resultado de reativação de infecção materna pré-natal e (2) *infecção transplacentária exógena*, na qual a transmissão fetal ocorre como resultado da infecção materna durante a gestação (TREES; WILLIAMS, 2005).

A transmissão horizontal pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais presentes no cérebro, medula espinhal, coração e músculos, ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (DUBEY, 1999; ANDERSON;

ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000). A transmissão lactogênica de *N. caninum* já foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos, alimentados de colostro adicionado de taquizoítos, mas não há evidências de que esta transmissão ocorra naturalmente (DAVISON et al., 2001), embora recentemente *N. caninum* foi isolado do colostro de vacas infectadas (MOSKWA et al., 2007).

1.3 Patogênese da neosporose

Proteínas de superfície dos taquizoítos de protozoários do filo Apicomplexa possuem importante papel no reconhecimento de células hospedeiras (BOOTHROYD et al., 1998), proporcionando a adesão e invasão dessas células que são etapas cruciais no estabelecimento da infecção e subsequente sobrevivência e proliferação do parasito (LEI; DAVEY; ELLIS, 2005).

A invasão celular é o principal evento de processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa que apresentam um complexo apical utilizado pelo parasito durante a adesão e invasão de células hospedeiras (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002; HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006).

N. caninum reconhece receptores de superfície presentes nas células hospedeiras e libera proteínas de micronemas, roptrias e grânulos densos durante os eventos de invasão celular, que pode ser resumida nas seguintes etapas (NAGULESWARAN; MÜLLER; HEMPHILL, 2003; HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006):

- (1) A adesão inicial do parasito à célula hospedeira ocorre sem qualquer orientação e envolve antígenos de superfície imunodominantes do parasito (NcSAG1 e NcSRS2). Após a adesão inicial, os parasitos reorientam-se posicionando a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP). Neste momento, várias proteínas de micronemas (adesinas) são secretadas e responsáveis pela formação da espessa zona de junção e, em seguida, iniciam o movimento da junção que culmina com a invasão do parasito dentro do VP;
- (2) A membrana plasmática do hospedeiro é também utilizada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em vacúolo que não se funde com lisossomos;

- (3) Proteínas de roptrias são liberadas dentro do VP e estendem a MVP para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP;
- (4) Proteínas de grânulos densos modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento do parasito.

Os taquizoítos dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novos parasitos em poucos dias após a infecção e, subsequentemente, há lise da célula hospedeira e liberação dos taquizoítos que ficam livres para infectar uma variedade de tecidos e tipos celulares (HEMPHILL, 1999; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A infecção em células uterinas pode resultar em destruição dos tecidos maternos e fetais, iniciando resposta inflamatória e lesões, ao mesmo tempo em que o parasito entra na corrente sanguínea e invade outros tecidos, com predileção para o sistema nervoso central. A destruição de células fetais, associada à inflamação linfóide, também pode ocorrer em outros tecidos, tais como coração, músculo esquelético, pulmão e fígado (BARR et al., 1994).

1.4 Resposta imune a *Neospora caninum*

Como protozoário intracelular obrigatório semelhante a *T. gondii*, a resposta imune à infecção por *N. caninum* possui uma variação individual que pode ser explicada pela heterogeneidade genética do hospedeiro e uma variação compartimentalizada, pois o parasito tem a capacidade de disseminar entre os tecidos e cada compartimento tecidual tem sua resposta imune específica, particularmente no sistema nervoso central e na placenta (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

Ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, participam dos mecanismos que protegem o hospedeiro contra a infecção por *N. caninum*. A resposta imune protetora é fundamentalmente mediada por células e produção de citocinas, enquanto a resposta imune humoral participa diretamente na neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, controlando assim a disseminação da infecção (INNES et al., 2002).

Células T *helper* tipo 1 (Th1) secretam citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fatores de necrose tumoral alfa e beta (TNF- α e TNF- β) e interleucina (IL)-2 que ativam respostas imunes mediadas por células, enquanto células T *helper* tipo 2 (Th2) secretam principalmente as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecem a produção de anticorpos. As células Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias, ou seja, IL-10 produzida por células Th2 inibe o desenvolvimento das células Th1, enquanto IFN- γ secretado por células Th1 previne a ativação de células Th2 (KIDD, 2003).

Os mecanismos de proteção do hospedeiro contra *N. caninum* são similares em muitos aspectos à resposta imune contra *T. gondii* (KHAN et al., 1997). Em infecções naturais, a primeira barreira física que os parasitos encontram ao invadir o tecido do hospedeiro é representada pelos enterócitos e as junções intercelulares espessas da mucosa intestinal que tentam deter a invasão dos parasitos pela via oral. Os enterócitos infectados podem secretar moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO), a citocina IL-15 que ativa as células *natural killer* (NK) para produzir IFN- γ e quimiocinas importantes no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas. Estas células inflamatórias, quando estimuladas pelos parasitos, secretam a citocina IL-12, importante na ativação de células NK e células T CD4+, induzindo a diferenciação para a subpopulação de células Th1 produtoras de IFN- γ , que por sua vez, ativam macrófagos, células dendríticas e enterócitos que irão destruir os parasitos, sendo estes eventos críticos para a sobrevivência do hospedeiro (BUZONI-GATEL et al., 2006).

Células T CD8⁺ contribuem para controlar as infecções agudas devido à produção de IFN- γ e ativação de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8⁺ liberando taquizoítos, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos como anticorpos, macrófagos ativados e células NK. Desta forma, IFN- γ representa o principal mediador de resistência por meio da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação de parasitos pela produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio (HUGHES, 1988; ADAMS et al., 1990; TANAKA et al., 2000). Além disso, IFN- γ pode ativar a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano, fundamental para o crescimento intracelular de parasitos estreitamente relacionados, como *T. gondii* e *N. caninum* (PFEFFERKORN; REBHUN; ECKEL, 1986; OLIVEIRA et al., 2006; SPEKKER et al.,

2009).

Como controle das atividades microbicidas e da resposta pró-inflamatória que podem causar imunopatologia intestinal, linfócitos intra-epiteliais atuam produzindo o fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β) que limita a produção de IFN- γ e destrói enterócitos infectados (BUZONI-GATEL et al., 2006). TGF- β é secretado por uma subpopulação de células T *helper* tipo 3 (Th3) que possuem marcador para CD4 e não secretam IL-2, IFN- γ ou IL-4 (MOSMANN; SAD, 1996; JONULEIT et al., 2002; MILLS; McGUIRK, 2004). A citocina TGF- β inibe a diferenciação e proliferação de células Th1, além de alterar a expressão de receptores para TNF- α e moléculas co-estimulatórias nas superfícies celulares de macrófagos e linfócitos, como CD40-CD40L (TAKEUCHI; ALARD; STREILEIN, 1998). Além disto, TGF- β regula a expressão do fator de transcrição T-bet que, na presença de infecção, tem sua expressão aumentada em linfócitos produtores de IFN- γ (NEURATH et al., 2002).

Uma citocina antiinflamatória que pode ser importante na regulação da resposta imune celular a *N. caninum* é IL-10, produzida predominantemente por macrófagos e células Th2, uma vez que possui efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ , a diferenciação e ativação de clones de células Th1, a produção de IFN- γ por células NK e células T CD4+ ou CD8+ e a produção de IL-12 por células acessórias (INNES et al., 2002).

A despeito da importante resposta imune desenvolvida no organismo hospedeiro após infecção por microorganismos, parasitos intracelulares também desenvolveram mecanismos de evasão ao sistema de defesa do organismo. Um exemplo disso é a estimulação da produção de lipoxinas, eicosanóides endógenos que apresentam propriedades antiinflamatórias em células hospedeiras com infecção parasitária, como estratégia para escape do parasito à resposta imune do hospedeiro, impedindo resposta inflamatória exacerbada (BANNENBERG et al., 2004).

1.5 Células trofoblásticas

No momento da implantação no útero materno, o embrião encontra-se na fase de blastocisto, uma estrutura esférica e cavitária onde se distinguem duas populações celulares: a massa celular interna, que dará origem ao corpo do embrião e o trofoblasto, uma camada de células que circunda essa massa celular interna e a

blastocelo (cavidade do blastocisto) (FERRO, 2000).

No instante em que se inicia a invasão da mucosa uterina, o trofoblasto diferencia-se em duas populações celulares distintas: o citotrofoblasto, uma camada mononuclear e o sinciciotrofoblasto, proveniente do citotrofoblasto (GUDE et al., 2004). Uma vez estabelecida a estrutura da placenta, observa-se a associação de cito e sinciciotrofoblasto e forma-se uma camada celular contínua na interface materno-fetal, estabelecendo assim uma barreira física e metabólica entre a circulação fetal e materna (STULC, 1989).

O trofoblasto é um tipo celular conhecido por sua capacidade intensa de proliferação e diferenciação, com inúmeras funções durante toda gestação, dentre elas: adesão, fixação do embrião à mucosa uterina receptiva, implantação do blastocisto ao endométrio, nutrição do embrião através da fagocitose de elementos sanguíneos maternos, regulação hormonal e formação da porção fetal da placenta (FERRO, 2000). As células trofoblásticas apresentam mecanismos que regulam o padrão de respostas imunes secretando citocinas como IL-10, TGF- β , fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), TNF- α , IFNs, IL-1 e IL-6 (ENTRICAN, 2002).

Além dessas funções, o trofoblasto possui um mecanismo essencial que possibilita a sua sobrevivência no organismo materno, pois deixa de expressar algumas proteínas de superfície, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, não permitindo a apresentação de antígenos paternos ao sistema imunológico materno, apesar de estar em contato íntimo com o sangue da mãe (ENTRICAN, 2002). Em resumo, o trofoblasto possui características próprias que regulam o processo de penetração na parede uterina e placentação; o citotrofoblasto expressa moléculas de adesão e proteinases que possibilitam a fixação e invasão; e fatores imunomoduladores produzidos são importantes para permitir a tolerância materna ao feto que é semi-alogeneico (NORWITZ; SCHUST; FISHER, 2001).

1.6 Linhagem de células BeWo

A linhagem de células trofoblásticas BeWo, isolada de um coriocarcinoma humano (PATTILLO; GEY, 1968), forma monocamada celular não se diferenciando em sincício e oferece uma alternativa no sistema de cultura de células para estudos relacionados a transporte transplacentário e moléculas envolvidas, efeito de drogas

sobre esta população celular e interações com patógenos, como *T. gondii* (PFAFF et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008).

As células trofoblásticas BeWo apresentam propriedades morfológicas e marcadores bioquímicos comuns ao trofoblasto humano (VAN DER ENDE et al., 1990), além de possuir muitas características de células trofoblásticas normais tais como, secreção hormonal e de citocinas IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 e secreção de matriz rica em laminina 10 *in vitro* (BENNETT et al., 1997; MORAES-PINTO et al., 1997; CHURCH; APLIN, 1998; FUJISAWA et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que células BeWo produzem progesterona de maneira semelhante ao encontrado em trofoblasto de gestação de primeiro trimestre, sugerindo que estas células podem ser modelos experimentais deste período gestacional (TSUI et al., 2004).

1.7 Resposta imune na gestação

Dentre os diversos fatores que contribuem para o sucesso da gestação, destaca-se a complexa rede de moléculas regulatórias que interagem entre si e se adaptam às condições gestacionais. Hormônios, moléculas sinalizadoras, citocinas e fatores de crescimento fazem parte desta família de moléculas, algumas produzidas por componentes locais presentes no trato genital feminino, outras alcançando o sítio de implantação pela circulação sanguínea (WEGMANN et al., 1993).

Os hormônios atuam como coadjuvantes na diferenciação de células T *helper* e na produção de citocinas dos tipos Th1 ou Th2. A relaxina, por exemplo, produzida pelo corpo lúteo, favorece um perfil Th1 de citocinas humanas, enquanto a progesterona favorece o padrão Th2. O estradiol-17 β aumenta a secreção de IL-10 e IFN- γ por clones ativados de células T estimuladas por antígeno, sendo que em altas concentrações o estradiol favorece a produção de IL-10 e, em baixas concentrações, a de IFN- γ (ENTRICAN, 2002).

Diversas funções são atribuídas às citocinas durante a gestação como a manutenção do corpo lúteo, a adesão e implantação do blastocisto ao endométrio, o desenvolvimento placentário e fetal, as diferenciações celulares e a manutenção de mecanismos imunes tolerantes ao conceito (SCHÄFER-SOMI, 2003).

Durante o período gestacional as funções fisiológicas maternas estão alteradas e o sistema imune normalmente apresenta um estado de tolerância aos antígenos fetais (ZENCLUSSEN, 2006). Para proteger o desenvolvimento fetal do sistema

imunológico materno há uma mudança no perfil de produção de citocinas com tendência para um perfil Th2, com produção de citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , as quais são sintetizadas na interface materno-fetal, principalmente por células da decídua e da placenta fetal em todo o período gestacional (LIN et al., 1993; SAITO, 2000; RAGHUPATHY, 2001).

Entretanto, a presença de citocinas do perfil Th2 na interface materno-fetal não exclui a produção de citocinas Th1 nesse local. Células trofoblásticas no primeiro trimestre de gestação expressam IFNs, IL-1 α e IL-1 β (BOWEN et al., 2002) e um desequilíbrio na síntese ou secreção dessas citocinas pode causar a interrupção da gestação. Macrófagos uterinos ativados ao liberarem TNF- α , estimulam os linfócitos a causarem apoptose de células trofoblásticas (DRAKE; HEAD, 1989), atuando contrariamente à gestação. Apesar disso, estas células são fundamentais para o desenvolvimento normal da gestação, uma vez que atuam na remoção de células trofoblásticas apoptóticas (ABRAHAMS et al., 2004). Dessa maneira, os macrófagos residuais uterinos previnem a liberação de antígenos fetais, que poderiam estimular uma resposta inflamatória prejudicial à sobrevivência do embrião.

Qualquer disfunção do estado imunológico pode potencializar a produção de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-2 que são prejudiciais ao feto, podendo levar ao aborto (RAGHUPATHY, 2001). Contudo, há evidências que a manutenção de diferentes etapas da gestação depende do estabelecimento de um balanço entre citocinas pró e antiinflamatórias que é propiciado por alguns hormônios produzidos durante a gestação (WEGMANN et al., 1993; SIMON et al., 1998; ENTRICAN, 2002).

Citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-8 têm papel fundamental durante o processo de implantação e parto, fenômenos estes correlacionados com uma transitória reação inflamatória local (SIMON et al., 1998; ZOURBAS, 2001); enquanto, citocinas com atividade antiinflamatória são de fundamental importância na manutenção da gestação (SCHÄFER-SOMI, 2003), como o TGF- β que propicia uma estratégia anti-rejeição do feto semi-alogeneico por inibir células produtoras de citocinas Th1 e atividade de células NK (RAGHUPATHY, 2001).

A citocina denominada fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é produzida por diferentes tipos celulares, tais como linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e basófilos (LUE et al., 2002). MIF é também expresso em altas quantidades em tecidos humanos em estágios de

pré-implantação e durante a implantação embrionária (ARCURI et al., 1999) e já foi detectado em membranas fetais, fluido amniótico e placenta (ARCURI et al., 2007).

Células mononucleares presentes no espaço interviloso produzem maior quantidade de MIF que células mononucleares do sangue periférico (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002). O aumento na produção de quimiocinas na placenta durante uma reação inflamatória contribui para que haja um acúmulo de macrófagos e monócitos no espaço interviloso e, provavelmente, o aumento nos níveis de MIF no espaço interviloso possa exercer importante papel na ativação de macrófagos, suprimindo ou minimizando o efeito imunossupressor dos hormônios corticóides na placenta (SUGUITAN et al., 2003; PFAFF et al., 2005).

MIF é também reconhecido como importante regulador da imunidade inata e adquirida, indutor de respostas inflamatórias a vírus e bactérias (BERNHAGEN et al., 1993; CALANDRA et al., 1995) e tem a propriedade de ativar macrófagos e promover a morte de parasitos intracelulares (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998). Isto se deve à capacidade de inibir a migração randômica de macrófagos, sugerindo que estes se acumulem no local de atuação (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998), além de regular a atividade de células NK (APTE et al., 1998). Embora MIF possa ser patogênico por promover resposta inflamatória excessiva, em concentrações adequadas, parece induzir resposta inflamatória capaz de promover proteção contra infecções e assegurar rápida e eficiente eliminação de parasitos (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002).

Desta forma, esta complexa rede de sinalização por meio de citocinas na interface materno-fetal adquire papel crucial durante infecções por microorganismos intracelulares como os protozoários *T. gondii* e *N. caninum*.

1.8 Células trofoblásticas e infecções placentárias

Durante a gestação normal, no ambiente uterino há predominância de resposta imune com produção de citocinas anti-inflamatórias pelas células maternas e fetais importantes em assegurar a tolerância imunológica ao concepto. Em contraste, há diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias associadas à resposta imune de perfil Th1 que são prejudiciais à vida do feto (RAGHUPATHY, 1997; CLARK; ARCK; CHAOUAT, 1999). Infecções por protozoários intracelulares como *T. gondii* e *N. caninum*, no entanto, induzem resposta imune típica Th1 e podem alterar o perfil

de citocinas na interface materno-fetal (INNES et al., 2002; FERRO et al., 2008).

Como visto anteriormente, a resistência das células hospedeiras aos protozoários intracelulares como *T. gondii* e *N. caninum* é principalmente mediada por citocinas de perfil Th1, como IFN- γ e IL-12, enquanto citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-10 estão associadas ao aumento da susceptibilidade à infecção (KHAN; SMITH; KASPER; 1994; HUNTER et al., 1995; INNES et al., 1995; KHAN et al., 1997; INNES et al., 2002). Neste contexto, a susceptibilidade da gestante à toxoplasmose pode ser devido ao desvio da resposta imune para um perfil de citocinas do tipo Th2 que é mantido durante a gestação (SHIRAHATA et al., 1992). Assim, citocinas típicas da gravidez aumentam a susceptibilidade à toxoplasmose e, conseqüentemente, o risco de infecção placentária e transmissão congênita (SHIRAHATA et al., 1992). Entretanto, PFAFF e colaboradores (2007) demonstraram o papel duplo de IFN- γ na infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal, mostrando efeitos benéficos no controle do parasitismo, porém prejudiciais ao desenvolvimento fetal bem como facilitadores da transmissão ao feto.

As funções do trofoblasto, especialmente na presença de infecções por parasitos intracelulares como *T. gondii*, têm sido estudadas usando-se linhagens celulares pré-estabelecidas, como as células trofoblásticas BeWo de coriocarcinoma humano (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). Dados da literatura demonstraram que células BeWo são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* que a linhagem de células epiteliais do cérvix uterino humano (HeLa), uma vez que aquelas não controlam a replicação do parasito, mesmo após administração exógena de IFN- γ , enquanto células HeLa mostraram-se dependentes de IFN- γ para conter o crescimento parasitário (OLIVEIRA et al., 2006). Assim, foi sugerido que IFN- γ , citocina importante contra patógenos intracelulares, pode não constituir a via que controla a sobrevivência do parasito em células BeWo.

A maior susceptibilidade de células trofoblásticas BeWo à infecção por *T. gondii* foi posteriormente investigada, demonstrando que ela está relacionada aos mecanismos de imunomodulação exercidos pelas citocinas IL-10 e TGF- β (BARBOSA et al., 2008). Desta forma, o papel das células trofoblásticas em manter um microambiente placentário favorável à gestação pode facilitar a infecção em tecidos da placenta.

Um estudo anterior mostrou que o trofoblasto está diretamente envolvido na patogênese da toxoplasmose congênita (FERRO et al., 1999). Com relação à

neosporose, estudos *in vivo* mostraram a invasão parasitária de trofoblastos em camundongos infectados com *N. caninum* (LONG; BASZLER, 1996). Mais recentemente, uma linhagem de células trofoblásticas ovinas foi clonada e imortalizada para estudar a patogênese da neosporose (HALDORSON et al., 2006), e células binucleadas trofoblásticas bovinas foram consideradas como células fagocíticas importantes na infecção transplacentária bovina por *N. caninum*, permitindo que o parasito atinja tecidos fetais (MACHADO et al., 2007). Entretanto, até o presente momento, não há dados na literatura sobre a interação entre *N. caninum* e células trofoblásticas humanas. Neste contexto, células trofoblásticas BeWo poderiam constituir um excelente modelo de estudo *in vitro* para investigar a interação patógeno-hospedeiro na interface materno-fetal em neosporose.

2 JUSTIFICATIVA

Como a transmissão transplacentária é a via principal de persistência da neosporose em bovinos, investigações *in vitro* focalizando as interações do parasito com células placentárias têm sido desenvolvidas e demonstram que trofoblastos da placenta estão diretamente envolvidos na patogênese natural da transmissão congênita.

Considerando que as células BeWo são células humanas derivadas de coriocarcinoma e que apresentam propriedades morfológicas e bioquímicas semelhantes às células trofoblásticas humanas, estudos *in vitro* têm sido realizados para melhor entender o papel destas células na imunologia da gestação e, especialmente, na presença de infecções por parasitos intracelulares como *T. gondii*. No entanto, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a interação de *N. caninum* com células trofoblásticas BeWo. Assim, o presente estudo se justifica pela possibilidade de analisar um modelo *in vitro* de investigação da susceptibilidade de células BeWo, comparado às células epiteliais uterinas humanas (linhagem HeLa), à infecção por *Neospora caninum* e o papel das citocinas envolvidas no processo de imunomodulação por este parasito.

Até o presente momento, não há relatos comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos, mas sim evidências sorológicas de exposição ao parasito, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. Desta forma, o presente estudo proporciona um maior entendimento da relação patógeno-hospedeiro e das citocinas envolvidas durante a infecção congênita por *N. caninum*, do seu potencial zoonótico e das diferenças relevantes em relação ao parasito estreitamente relacionado, *T. gondii*, que causa importante infecção congênita em humanos e ovinos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e células epiteliais do cérvix uterino humano (linhagem HeLa) à infecção por *Neospora caninum*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade e lise celular das linhagens BeWo e HeLa após infecção por *N. caninum*;
- Investigar o perfil de citocinas (IFN- γ , IL-10, TGF- β e MIF) e liberação de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células BeWo e HeLa infectadas por *N. caninum* e pré-tratadas com antígeno de lisado de *Neospora* (NLA) ou IFN- γ recombinante humano;
- Determinar os índices de infecção e replicação intracelular de *N. caninum* em células BeWo e HeLa pré-tratadas com antígeno de lisado de *Neospora* (NLA) ou IFN- γ recombinante humano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células BeWo e HeLa

Células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo, CCL-98) e células epiteliais do cérvix uterino humano (linhagem HeLa, CCL-2) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia. O projeto de pesquisa deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres ou materiais biológicos humanos (ANEXO A).

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25 cm² (TPP®, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) inativado a 56°C por 30 min. As células foram incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C.

Quando a monocamada celular atingiu a confluência, as células foram transferidas para outros frascos de cultura (repique celular) da seguinte forma: o meio foi removido, adicionou-se novo meio RPMI com 10% de SFB (meio completo) e, com auxílio de *cell scraper* (TPP®) as células foram descoladas do fundo do frasco, transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 720 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo e distribuído em novos frascos de cultura de 25 cm² contendo 4 mL de meio RPMI completo, seguindo-se incubação a 37°C e 5% de CO₂.

4.2 Manutenção e obtenção de taquizoítos de *Neospora caninum*

Parasitas do isolado Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) de *N. caninum* foram obtidos de cultura de monócitos bovinos (linhagem celular M617) e mantidos por baixa

passagem seriada em células BeWo ou HeLa cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² em meio RPMI suplementado sem adição de SFB (meio incompleto). Após 48-72 horas de infecção, parasitos foram coletados por descamação da monocamada celular (*cell scraper*), transferidos para tubos de 15 mL e centrifugados a 720 x *g* por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de meio incompleto e adicionado em novos frascos de cultura de 25 cm² contendo monocamada de células BeWo ou HeLa, e mantidos como descrito acima com a finalidade de cultivar taquizoítos de *N. caninum in vitro* para serem usados em experimentos de infecção e preparação de antígeno.

4.3 Preparação de antígeno de *Neospora caninum*

Antígeno lisado de *N. caninum* (NLA) foi preparado como descrito anteriormente (SILVA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009), com pequenas modificações. Parasitos foram coletados por descamação da monocamada celular (*cell scraper*) de células BeWo ou HeLa após 2-3 dias de infecção e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 25x7 mm para lisar células hospedeiras intactas e por centrifugação rápida em baixa velocidade (45 x *g*, 1 minuto, 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante contendo parasitos foi coletado e lavado por duas vezes (720 x *g* por 10 minutos a 4°C) com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 1 mL de PBS e armazenado a -20°C.

Suspensões parasitárias foram posteriormente descongeladas e lisadas por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, sendo que a presença de parasitos vivos foi monitorada por microscopia de luz sob coloração de azul de Trypan a 0,4% em PBS. Após centrifugação (10.000 x *g* por 30 minutos a 4°C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de 0,22 µm (filtros Millex, Millipore Indústria e Comércio Ltda, Barueri, SP, Brasil) e sua concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Diferentes preparações de NLA foram realizadas e reunidas de modo a obter a concentração protéica requerida. Alíquotas de NLA foram armazenadas a -20°C até a utilização em experimentos de pré-tratamento das células.

4.4 Infecção de células BeWo e HeLa por *Neospora caninum*

Parasitas foram coletados de células BeWo ou HeLa após 2-3 dias de infecção e purificados como descrito acima (ítem 4.3). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspensão em 2 mL de PBS e parasitos foram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer e analisados quanto à viabilidade pelo corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% em PBS, para utilização em experimentos de infecção das células.

Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de cultura celular de 96 poços (Corning Incorporated Costar, New York, NY, EUA), em meio RPMI completo, na concentração de 2×10^4 células/200µL/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. As células foram então lavadas com meio incompleto e infectadas com taquizoítos de *N. caninum* em diferentes proporções de parasito:célula (2:1, 5:1 ou 10:1) em meio incompleto. Como controle, as células foram incubadas com meio somente.

Após 24, 48 ou 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10 minutos), o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para os ensaios de lise celular através da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). As células também foram analisadas quanto à viabilidade celular utilizando a análise colorimétrica do tetrazólio de metiltiazol (ensaio de MTT). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

4.4.1 Ensaio de MTT

A viabilidade de células BeWo e HeLa infectadas ou não com o parasito foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico de MTT, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983). Em resumo, após diferentes tempos de infecção (24, 48 ou 72 horas), as placas de cultura foram centrifugadas (400 x g por 10 minutos), os sobrenadantes foram removidos e 100 µL/poço de tetrazólio de metiltiazol (MTT, Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/mL em meio RPMI completo foram adicionados 4 horas antes do final de cada período de infecção (20, 44 ou 68 horas) e as placas incubadas em condições de cultura. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas (400 x g por 10 minutos), os sobrenadantes foram removidos e as partículas insolúveis de coloração roxa (cristais de formazan) produzidas por células

viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas pela adição de 100 µL/poço de 10% duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA) e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação aos controles (100%). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

4.4.2 Análise da liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A lise celular foi avaliada pela determinação de LDH presente nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HeLa infectadas e não-infectadas (controles), como descrito anteriormente (LUCISANO-VALIM et al., 2002; PINHEIRO et al., 2006; ALVES et al., 2009).

Em resumo, sobrenadantes de cultura foram coletados após cada período de infecção (24, 48 ou 72 horas), centrifugados a 2300 x g por 5 minutos e armazenados a -70°C. A atividade de LDH foi quantificada nos respectivos sobrenadantes utilizando kit comercialmente disponível, de acordo com as instruções do fabricante (LDH Liquiform, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil) e expressa em U/mL. Como controle positivo, a lise celular total foi obtida com 0,2% Triton X-100. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

4.5 Pré-tratamento de células BeWo e HeLa e infecção por *Neospora caninum*

Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de cultura celular de 96 poços (Corning Incorporated Costar), na concentração de 5×10^4 células/200µL/poço em meio RPMI completo por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram lavadas com meio e tratadas com IFN-γ recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) a 10 ng/mL, ou NLA a 10 µg/mL, ou não-tratadas (NT, meio completo somente) por mais 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Em seguida, as células foram novamente lavadas com meio incompleto e infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na proporção de 5:1 (parasito:célula) em meio incompleto, como previamente estabelecido em experimentos anteriores. Como controles, células tratadas ou não foram mantidas com meio somente

(controles não-infectados). Após 24 e 48 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados (2300 x *g* por 5 minutos) e armazenados a -70°C para os ensaios de dosagem de citocinas e determinação de nitrito. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

4.5.1 Determinação de citocinas

Os sobrenadantes de cultura de células BeWo e HeLa tratadas ou não com IFN- γ ou NLA e infectadas ou não com *N. caninum* foram analisados para investigar a presença das citocinas IFN- γ , IL-10, TGF- β e MIF por meio de ELISA *sandwich*, utilizando os respectivos anticorpos de captura, anticorpos de detecção biotinilados e citocinas recombinantes humanas comercialmente disponíveis (R&D System), seguindo as instruções do fabricante.

Em resumo, placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de alta afinidade (Corning Incorporated Costar) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e subsequentemente bloqueadas com soluções bloqueadoras apropriadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Após lavagem das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas humanas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. As placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzidina - TMB). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA).

Os limites de sensibilidade desses ensaios foram 15,6 pg/mL para IFN- γ e 31,3 pg/mL para IL-10, TGF- β e MIF. Os coeficientes de variação intra-análise e inter-análise ficaram abaixo de 20% e 10%, respectivamente.

4.5.2 Determinação de nitrito

A produção de óxido nítrico durante a infecção por *N. caninum* foi avaliada pela determinação de nitrito em sobrenadantes de cultura de células BeWo e HeLa tratadas ou não com IFN- γ ou NLA e infectadas ou não infectadas, utilizando a análise de Griess (GREEN et al., 1982), já que o óxido nítrico, derivado do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina decompõe-se espontaneamente em nitrito e nitrato no meio de cultura.

Em resumo, 50 μ L dos sobrenadantes de cultura foram adicionados em cada poço de placas de microtitulação de 96 poços e incubados com igual volume (50 μ L) do reagente de Griess (1% dihidroclorato de sulfanilamida e 0,1% dihidroclorato de naftilenodiamida em 2,5% ácido fosfórico, v/v). A densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placas e os resultados foram expressos em nanomoles pela comparação com os valores de absorbância obtidos em uma curva padrão usando nitrito de sódio, com concentração variando de 200 a 3 μ M.

4.6 Análises de infecção e replicação de *Neospora caninum* em células hospedeiras

Células Bewo e HeLa foram cultivadas sobre lamínulas redondas de vidro de 13 mm de diâmetro (Ciencor Scientific Ltda, São Paulo, SP, Brasil), inseridas dentro de uma placa de cultura de 24 poços (Corning Incorporated Costar), na concentração de 5×10^4 células/200 μ L/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. As células foram lavadas com meio RPMI incompleto e tratadas com IFN- γ recombinante humano (10 ng/mL) ou NLA (10 μ g/mL), ou não-tratadas (NT) por mais 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram novamente lavadas com meio incompleto e infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na proporção de 5:1 (parasitos: célula) em meio incompleto. Após 2 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células foram novamente lavadas com meio incompleto para eliminar os parasitas não-aderentes e incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições.

As células foram então lavadas com PBS, fixadas em 10% formalina tamponada com fosfatos por duas horas, lavadas novamente com PBS e coradas com 1% azul de toluidina (Sigma Chemical Co.) por 3 segundos. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e as células foram examinadas sob microscópio de

luz em relação ao índice de infecção (porcentagem de células infectadas em 200 células examinadas) e a replicação intracelular do parasito (número médio de parasitos por célula em 200 células infectadas) conforme anteriormente descrito (BARBOSA et al., 2008). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata e analisados por dois observadores.

4.7 Ensaios de inibição da atividade de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO)

Para verificar se o pré-tratamento das células com IFN- γ poderia induzir ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e, conseqüentemente, interferir com a replicação intracelular do parasito, foram realizados ensaios de inibição da atividade de IDO por meio do tratamento com o inibidor da enzima IDO, 1- α -Metil-Triptofano (1-MT, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA), bem como ensaios com suplementação de L-Triptofano (TRIP, Sigma Chemical Co.) como descrito anteriormente (OLIVEIRA et al., 2006; SPEKKER et al., 2009).

Células HeLa foram cultivadas sobre lamínulas redondas de vidro de 13 mm de diâmetro inseridas dentro de uma placa de cultura de 24 poços (Corning Incorporated Costar), na concentração de 5×10^4 células/200 μ L/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram lavadas com meio RPMI incompleto e tratadas (500 μ L/poço) com 1,5 mM de 1-MT ou 1,0 mM de TRIP em meio RPMI completo ou somente com meio (controle) e incubadas por mais 2 horas, nas mesmas condições de cultura.

Após o período de incubação, as células foram tratadas ou não com IFN- γ recombinante humano (10 ou 100 ng/mL) e incubadas nas mesmas condições por mais 24 horas. O sobrenadante foi retirado e as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na proporção de 5:1 (parasito:célula) em meio incompleto. Após 2 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células foram novamente lavadas com meio incompleto para eliminar os parasitas não-aderentes e novamente tratadas com 1-MT ou TRIP ou meio RPMI a 2% de SFB nas mesmas concentrações anteriormente descritas e incubadas por mais 24 horas em condições de cultura.

As células foram então lavadas com PBS, fixadas, coradas e analisadas em relação ao índice de replicação intracelular do parasito (número médio de parasitos por célula em 100 células infectadas) como descrito no item 4.6. Um experimento foi realizado em triplicata e analisado por três observadores.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A comparação de dados entre células BeWo e HeLa foi analisada pelo teste *t* de *Student*. A comparação de dados entre células tratadas e não tratadas foi analisada pelo teste ANOVA (*one-way*) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.9 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de cultura celular, bem como manuseio de material biológico, utilização de vidraria, equipamentos e reagentes químicos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular após infecção por *Neospora caninum*

O número de células BeWo e HeLa viáveis após diferentes proporções e tempos de infecção por *N. caninum* foi avaliado por meio da análise colorimétrica do MTT (Figura 1). Foi observado maior viabilidade celular em células BeWo quando comparado às células HeLa após infecção por *N. caninum*, particularmente nas menores proporções de parasito:célula (2:1 e 5:1) após 24 e 48 horas de infecção (Figuras 1A e 1B) ($p < 0,05$). Entretanto, na maior proporção parasito:célula (10:1), células HeLa apresentaram maior viabilidade celular quando comparado às células BeWo em todos os tempos analisados (Figuras 1A, 1B, 1C) ($p < 0,01$).

Comparado aos controles não-infectados, ambas as linhagens celulares infectadas mostraram significativo aumento do número de células viáveis quando a proporção de parasito:célula e tempos de infecção também aumentaram (Figuras 1A e 1B) ($p < 0,001$). Após 72 horas de infecção, a viabilidade de células BeWo e HeLa diminuiu significativamente nas maiores proporções de parasito:célula (5:1 e 10:1) ($p < 0,01$) (Figura 1C).

A cinética da viabilidade celular durante os três tempos após a infecção (24, 48 e 72 horas) foi analisada para cada linhagem celular e comparada ao número de células viáveis após 24 horas de infecção (Figura 2). Observou-se um perfil cinético de viabilidade celular semelhante em ambas as linhagens de células, com um significativo aumento no número de células viáveis após 48 horas de infecção nas proporções parasito:célula 2:1 e 5:1 ($p < 0,001$), seguido por uma diminuição significativa na viabilidade celular após 72 horas de infecção em todas as proporções parasito:célula analisadas ($p < 0,0001$). Entretanto, na maior proporção parasito:célula (10:1), não houve diferença significativa na viabilidade celular após 24 e 48 horas de infecção, mas significativa redução foi observada após 72 horas de infecção ($p < 0,0001$) (Figuras 2A e 2B).

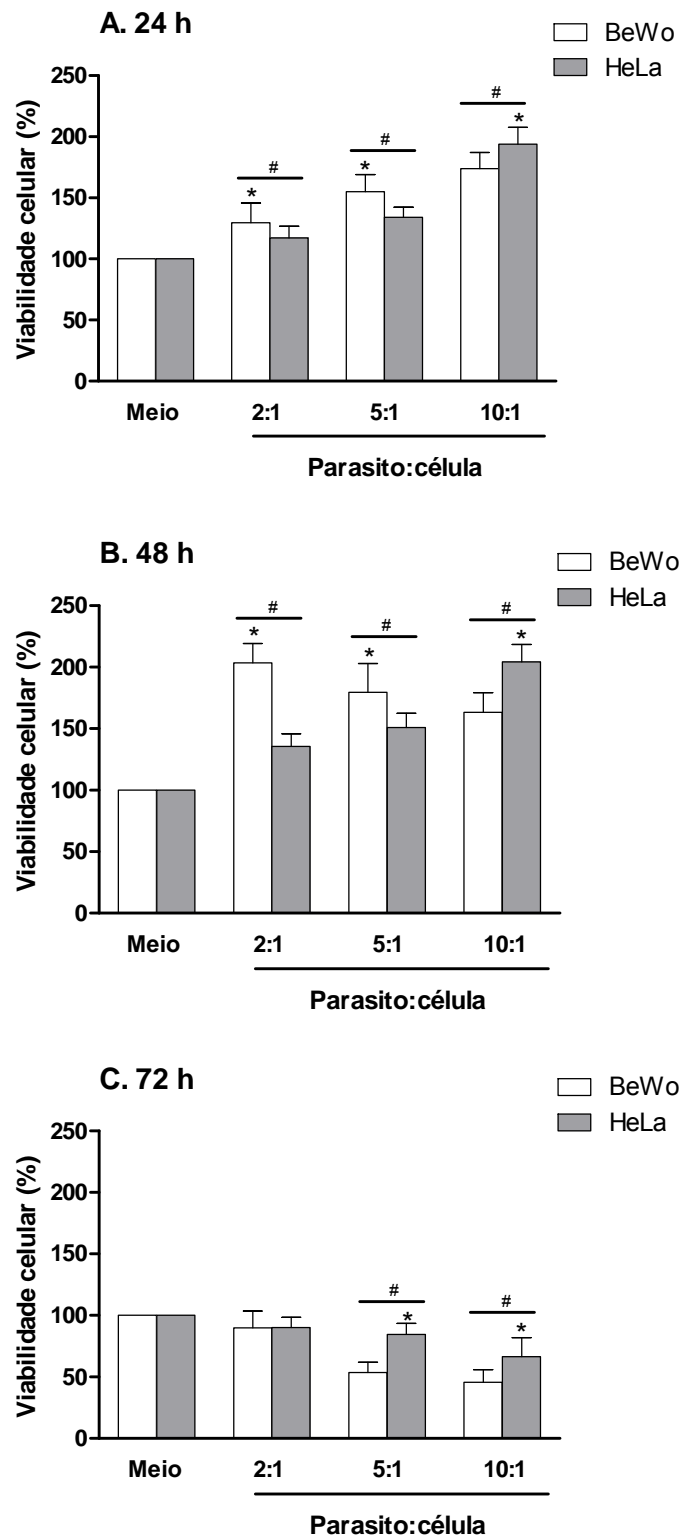


Figura 1. Viabilidade de células BeWo e HeLa após infecção por *Neospora caninum*. Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 céls/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de cultura, ambas as linhagens celulares foram infectadas com taquizóitos de *N. caninum* em diferentes proporções de parasito:célula (2:1, 5:1 e 10:1) ou mantidas em meio RPMI (controle). O número de células viáveis foi analisado utilizando o ensaio de MTT após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de infecção. Os dados estão expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle (média \pm DP) e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre células BeWo e HeLa em cada proporção parasito:célula (teste *t* de Student, $p < 0,05$); #Significância estatística em relação ao meio para cada linhagem celular e proporção parasito:célula (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

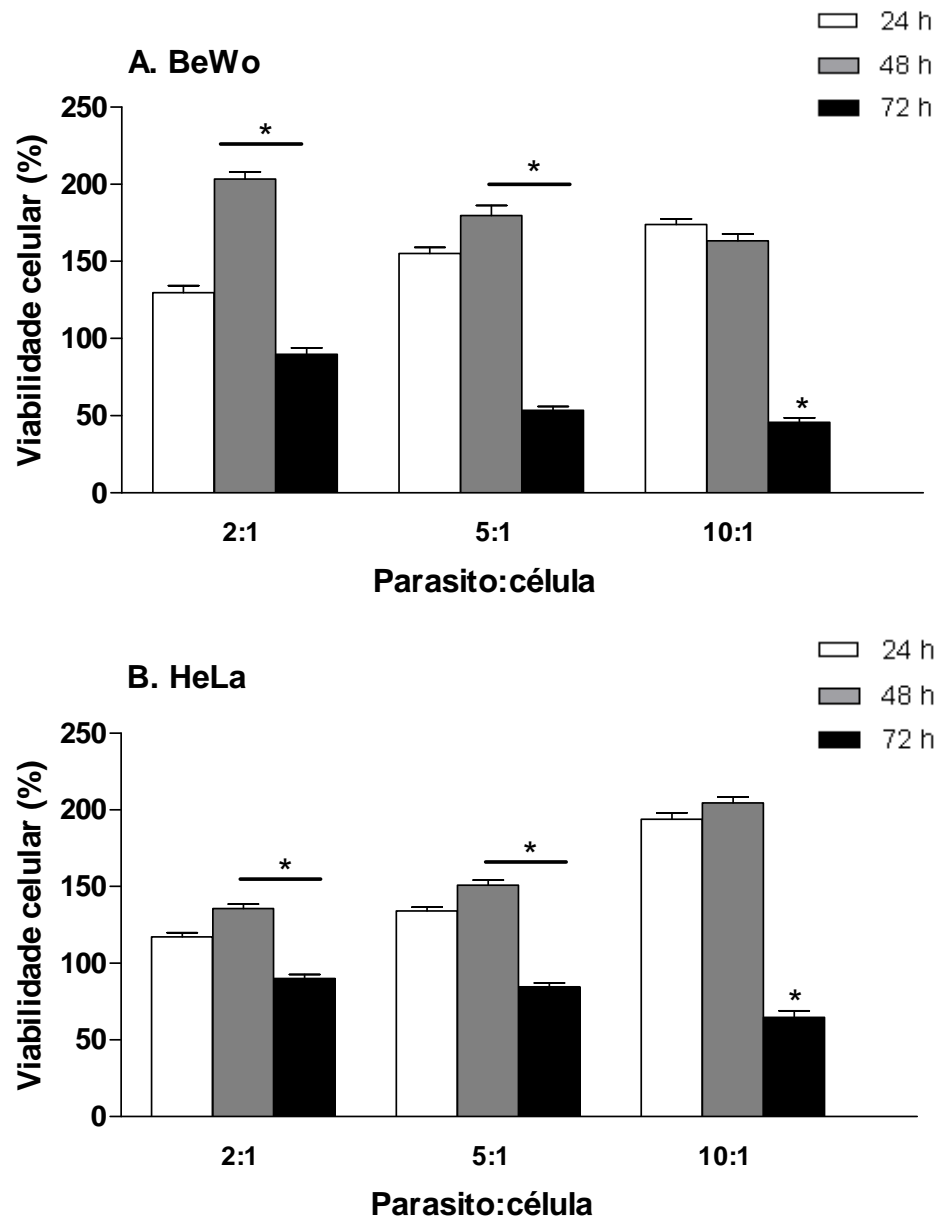


Figura 2. Cinética da viabilidade de células BeWo (**A**) e HeLa (**B**) após diferentes tempos de infecção por *Neospora caninum*. Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 céls/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 h de cultura, ambas as linhagens celulares foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* em diferentes proporções de parasito:célula (2:1, 5:1 e 10:1) ou mantidas em meio RPMI (controle). O número de células viáveis foi analisado utilizando o ensaio de MTT após 24, 48 e 72 h de infecção. Os dados estão expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle (média \pm DP) e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre o número de células viáveis após 48 e 72 h em relação a 24 h em cada proporção parasito:célula (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

5.2 Lise celular após infecção por *Neospora caninum*

A lise de células BeWo e HeLa após infecção por *Neospora caninum* em diferentes proporções parasito:célula e após diferentes tempos de infecção foi determinada pela mensuração da atividade de LDH liberada em sobrenadantes de cultura (Figura 3). A atividade de LDH foi maior em sobrenadantes de cultura após 24 horas de infecção em células HeLa comparada a células BeWo, e mostrou um aumento crescente quando as proporções parasito:célula também aumentaram ($p < 0,001$) (Figura 3A). Após 48 horas de infecção, a atividade de LDH foi semelhante entre as linhagens celulares, exceto na proporção de 5:1 (parasito:célula) que mostrou maior atividade de LDH para células HeLa ($p < 0,01$). Entretanto, ambas as linhagens de células mostraram aumento na atividade de LDH em relação aos controles não infectados ($p < 0,01$) (Figura 3B). Após 72 horas de infecção, foi observado um aumento significativo na atividade de LDH em ambas as linhagens celulares e em todas as proporções parasito:célula quando comparado aos controles não-infectados ($p < 0,0001$) (Figura 3C).

A cinética da atividade de LDH liberada por células BeWo e HeLa foi analisada após diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) de infecção por *N. caninum* (Figura 4). O perfil cinético da atividade de LDH foi semelhante entre as duas linhagens de células, mostrando um crescente e significativo aumento na atividade de LDH dependente do tempo de infecção em todas as proporções parasito:célula analisadas ($p < 0,001$) (Figuras 4A e 4B).

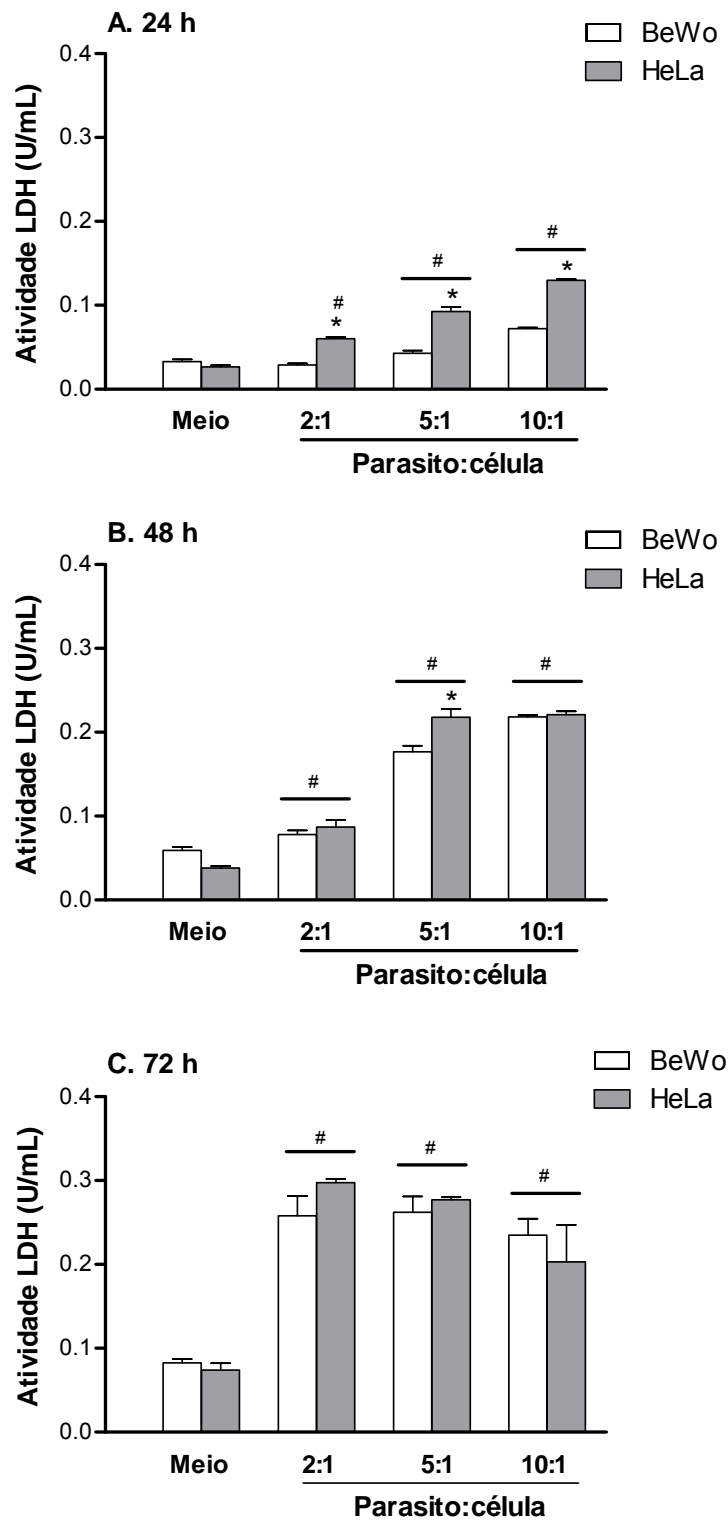


Figura 3. Atividade de lactato desidrogenase (LDH) liberada após lise de células BeWo e HeLa infectadas por *Neospora caninum*. Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 céls/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, ambas as linhagens celulares foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* em diferentes proporções parasito:célula (2:1, 5:1 e 10:1) ou mantidas com meio RPMI (controle). A atividade LDH foi medida em sobrenadantes de cultura coletados após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) utilizando o kit LDH Liquiform e expressa em U/mL. Os dados estão expressos em média \pm DP e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre células BeWo e HeLa em cada proporção de parasito:célula (teste *t* de Student, $p < 0,05$). #Significância estatística em relação ao meio em cada proporção parasito:célula (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

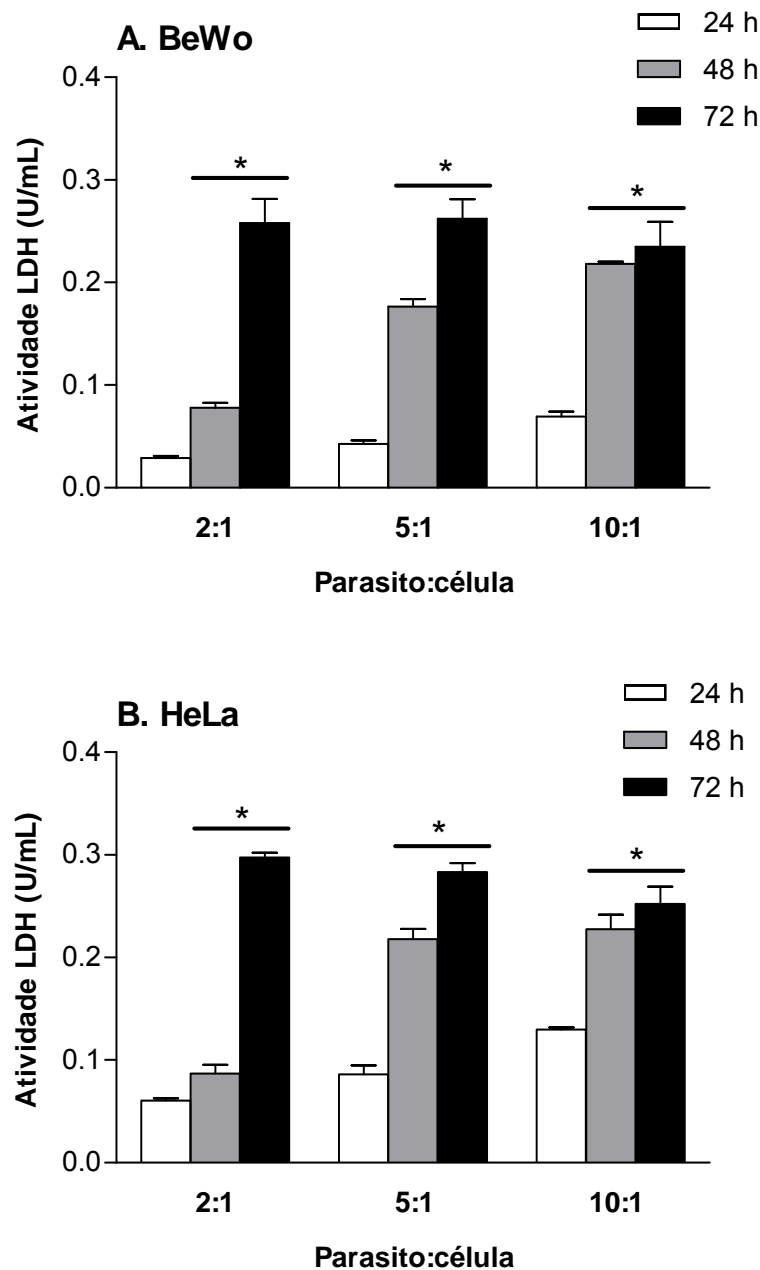


Figura 4. Cinética da atividade de LDH liberada por células BeWo (A) e HeLa (B) após diferentes tempos de infecção por *Neospora caninum*. Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 céls/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 h de cultura, ambas as linhagens celulares foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* em diferentes proporções de parasito:célula (2:1, 5:1 e 10:1) ou mantidas em meio RPMI (controle). A atividade LDH foi medida em sobrenadantes de cultura coletados após 24, 48 e 72 h utilizando o kit LDH Liquiform e expressa em U/mL. Os dados estão expressos em média \pm DP e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre atividade LDH após 48 e 72 h em relação a 24 h de infecção em cada proporção parasito:célula (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

5.3 Produção de citocinas por células BeWo e HeLa após infecção por taquizoítos de *Neospora caninum*

A produção de citocinas (IFN- γ , IL-10, TGF- β e MIF) foi avaliada em sobrenadantes de cultura de células BeWo e HeLa infectadas ou não por *N. caninum* e pré-tratadas ou não com NLA ou IFN- γ após 24 e 48 horas de cultura (Figura 5).

Após 24 horas de cultura (Figura 5A), a secreção de MIF foi relativamente baixa e semelhante em ambas as linhagens de células não-infectadas sob qualquer condição de pré-tratamento. Entretanto, após 24 horas de infecção, a concentração de MIF aumentou significativamente nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HeLa em todas as condições analisadas ($p < 0,0001$). Além disso, a produção de MIF foi maior em células HeLa infectadas por *N. caninum* comparado a células BeWo, mas o pré-tratamento com IFN- γ aumentou a secreção de MIF em ambas as linhagens de células comparado às células não-tratadas, enquanto que o pré-tratamento com NLA induziu um aumento da concentração de MIF somente em células HeLa ($p < 0,05$) (Figura 5A).

Após 48 horas de cultura (Figura 5B), a concentração de MIF aumentou em células BeWo não infectadas, mas não em células HeLa, exceto quando essas células foram pré-tratadas com IFN- γ , mostrando concentração similar às células BeWo. Após infecção, a produção de MIF foi consideravelmente aumentada em ambas as linhagens celulares ($p < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com NLA ou IFN- γ em células BeWo infectadas induziu uma diminuição significativa na secreção de MIF, mas não por células HeLa ($p < 0,0001$) (Figura 5B).

A secreção de TGF- β foi observada predominantemente em células BeWo não-infectadas após 24 horas de cultura (Figura 5C). No entanto, o pré-tratamento celular com NLA ou IFN- γ diminuiu a concentração de TGF- β em células HeLa não-infectadas, mas não em células BeWo ($p < 0,01$). Após a infecção por *N. caninum*, a concentração de TGF- β foi significativamente reduzida após pré-tratamento com NLA ou IFN- γ somente em células BeWo, embora ambos os tratamentos diminuíssem a produção de TGF- β em ambas as linhagens celulares em relação aos grupos não-tratados infectados ($p < 0,05$) (Figura 5C).

Após 48 horas de cultura (Figura 5D), a concentração de TGF- β foi acentuadamente maior em células BeWo não infectadas, mas não em células HeLa, e o pré-tratamento de células BeWo com IFN- γ aumentou ainda mais a concentração

da citocina ($p < 0,05$). Após infecção, foi observada significativa redução na produção de TGF- β por células BeWo em todas as condições analisadas, mas o pré-tratamento com IFN- γ diminuiu ainda mais os níveis da citocina em ambas as linhagens de células ($p < 0,001$). Embora diminuída, a concentração de TGF- β foi constantemente maior em células BeWo comparada às células HeLa após infecção por *N. caninum* ($p < 0,05$) (Figura 5D).

A produção de IL-10 e IFN- γ , bem como a secreção de nitrito por células BeWo e HeLa infectadas ou não por *N. caninum* ficaram abaixo do limite de detecção dos ensaios em todas as condições analisadas (dados não mostrados).

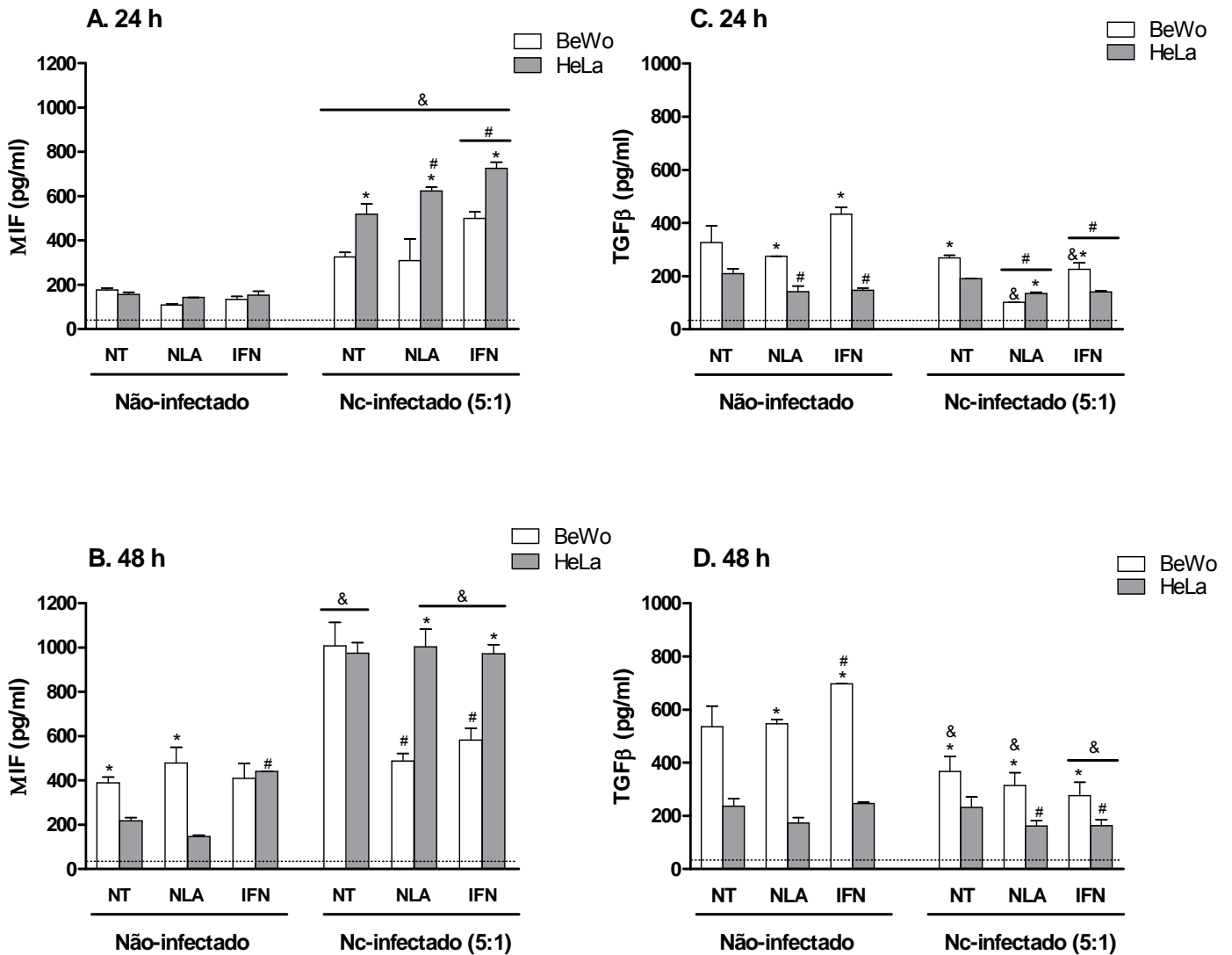


Figura 5. Secreção de MIF e TGF- β por células BeWo e HeLa após infecção por *Neospora caninum*. Células BeWo e HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 h de cultura, ambas as linhagens celulares foram pré-tratadas com antígeno lisado de *Neospora* (NLA, 10 μ g/mL) ou IFN- γ (10 ng/mL) ou meio (não-tratadas, NT). Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas e infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na proporção 5:1 (parasito:célula) ou não-infectadas (controle). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 h (A, C) e 48 h (B, D) de infecção para quantificação de citocinas por ELISA. Os dados estão expressos como média \pm DP e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. As linhas tracejadas indicam o limite de sensibilidade para cada ensaio (31,3 pg/mL). *Comparação entre células BeWo e HeLa para cada condição de tratamento (teste *t* de Student, $p < 0,05$); #Significância estatística em relação às células não-tratadas (NT) em cada linhagem celular (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$); &Comparação entre células infectadas (Nc) e não-infectadas em cada condição de tratamento (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

5.4 Infecção e replicação intracelular de *Neospora caninum* em células BeWo e HeLa

Os índices de infecção e replicação intracelular do parasito em células BeWo e HeLa foram determinados após 24 horas de infecção e de pré-tratamento celular com NLA ou IFN- γ (Figura 6). Foi observado maior índice de infecção em células HeLa comparado a células BeWo em todas as condições analisadas ($p < 0,0001$) (Figura 6A). Após o pré-tratamento com o NLA, células HeLa mostraram diminuição, embora não significativa, do índice de infecção ($p > 0,05$), enquanto o pré-tratamento com IFN- γ reduziu significativamente o índice de infecção em ambas as linhagens de células ($p < 0,01$).

Quanto ao índice de replicação intracelular do parasito (Figura 6B), foi observado um comportamento similar, com maior número de parasitos intracelulares visto em células HeLa que BeWo infectadas. Entretanto, diminuição significativa neste parâmetro ocorreu após o pré-tratamento com IFN- γ apenas em células HeLa.

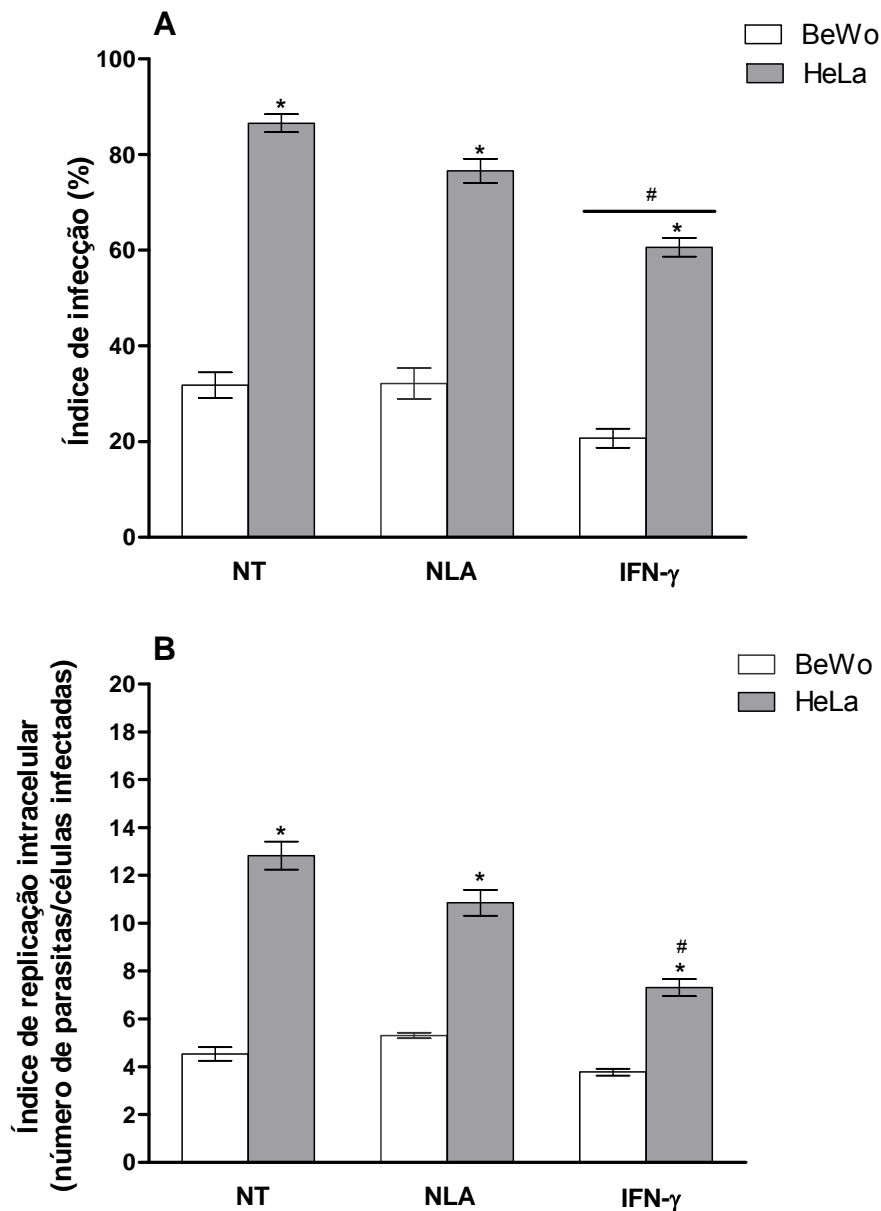


Figura 6. Infecção por *Neospora caninum* e replicação intracelular em células BeWo e HeLa. Células BeWo e HeLa foram cultivadas em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços (5×10^4 células/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de cultura, ambas as linhagens celulares foram pré-tratadas com antígeno lisado de *Neospora* (NLA, 10 μ g/mL) ou IFN- γ (10 ng/mL) ou meio somente (não-tratadas, NT). Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas, infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na proporção 5:1 (parasito:célula) e mantidas por 24 h em condições de cultura. Em seguida, as células foram lavadas, fixadas, coradas com azul de toluidina e analisadas em relação ao índice de infecção (**A**, porcentagem de células infectadas em 200 células examinadas) e à replicação intracelular do parasito (**B**, número médio de parasitos por células em 200 células infectadas). *Comparação entre células BeWo e HeLa para cada condição de tratamento (teste *t* de Student, $p < 0,05$); #Significância estatística em relação às células não-tratadas (NT) para cada linhagem celular (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

5.5 Efeito do pré-tratamento de células HeLa com IFN- γ e inibidor da enzima IDO ou suplementação com L-triptofano sobre a replicação intracelular de *Neospora caninum*

Para verificar se a diminuição dos índices de replicação intracelular de *N. caninum* em células HeLa pré-tratadas com IFN- γ foi dependente da ativação de IDO, foram realizados ensaios com pré-tratamento das células com inibidor da enzima IDO (1-MT) ou suplementação com L-triptofano (TRIP) na presença de IFN- γ , seguido de infecção por *N. caninum* (Figura 7).

Semelhante aos resultados observados na Figura 6B, o pré-tratamento celular com IFN- γ nas duas concentrações testadas (10 e 100 ng/mL) reduziu significativamente a replicação intracelular de *N. caninum* quando comparado com células não-tratadas ($p < 0,05$) (Figura 7). Entretanto, o pré-tratamento com 1-MT ou TRIP na presença de IFN- γ aumentou significativamente os índices de replicação parasitária em relação às células tratadas somente com IFN- γ ($p < 0,001$), indicando que estes tratamentos foram capazes de reverter o efeito do IFN- γ na inibição do crescimento do parasito (Figura 7).

Fotomicrografias representativas de células BeWo e HeLa não tratadas após 24 horas de infecção por *N. caninum* estão ilustradas nas Figuras 8 e 9, respectivamente, e mostram que células HeLa apresentam maior número de células infectadas e taquizoítos dentro dos vacúolos parasitóforos (Figura 9) do que células BeWo (Figura 8).

Fotomicrografias representativas de células BeWo ou HeLa não tratadas ou previamente tratadas com IFN- γ e analisadas após 24 horas de infecção com *N. caninum* estão ilustradas nas Figuras 10 e 11, respectivamente, e mostram menor número de células infectadas quando tratadas com IFN- γ comparado às células não tratadas. Além disso, observa-se menor número de taquizoítos dentro dos vacúolos parasitóforos em células HeLa previamente tratadas com IFN- γ quando comparado às células não tratadas (Figura 11).

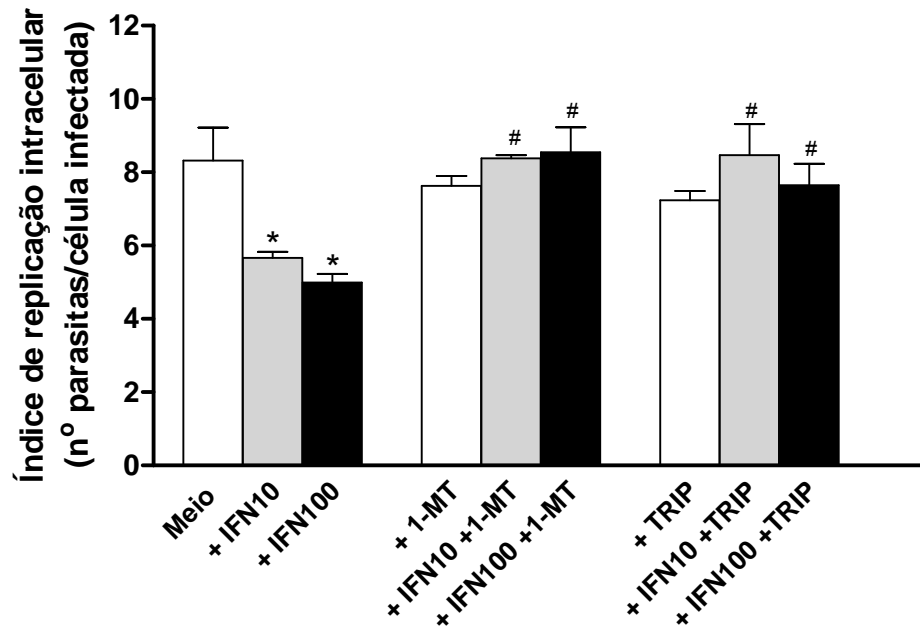


Figura 7. Efeito do tratamento de células HeLa com IFN- γ e/ou 1- α -Metil-Triptofano (1-MT) e/ou L-Triptofano (TRIP) sobre o índice de replicação intracelular de *Neospora caninum*. Células HeLa foram cultivadas em lâminulas de vidro inseridas em placas de 24 poços (5×10^4 células/200 μ L/poço) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram pré-tratadas com 1-MT (1,5 mM) ou L-Triptofano (TRIP, 1 mM) ou meio (controle) por 2 horas e, em seguida, tratadas com IFN- γ (10 e 100 ng/mL) por 24 horas. As células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na proporção 5:1 (parasito:célula) e tratadas novamente com 1-MT (1,5 mM) ou TRIP (1 mM) e incubadas por 24 h em condições de cultura. As células foram lavadas, fixadas, coradas com azul de toluidina e analisadas em relação ao índice de replicação intracelular do parasito (número médio de parasitos por células em 100 células infectadas). *Significância estatística em relação aos controles (barras brancas) dentro de cada grupo de tratamento (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$); #Significância estatística em relação aos respectivos tratamentos com IFN10 (barras cinzas) ou IFN100 (barras pretas) somente (teste t de Student, $p < 0,05$).

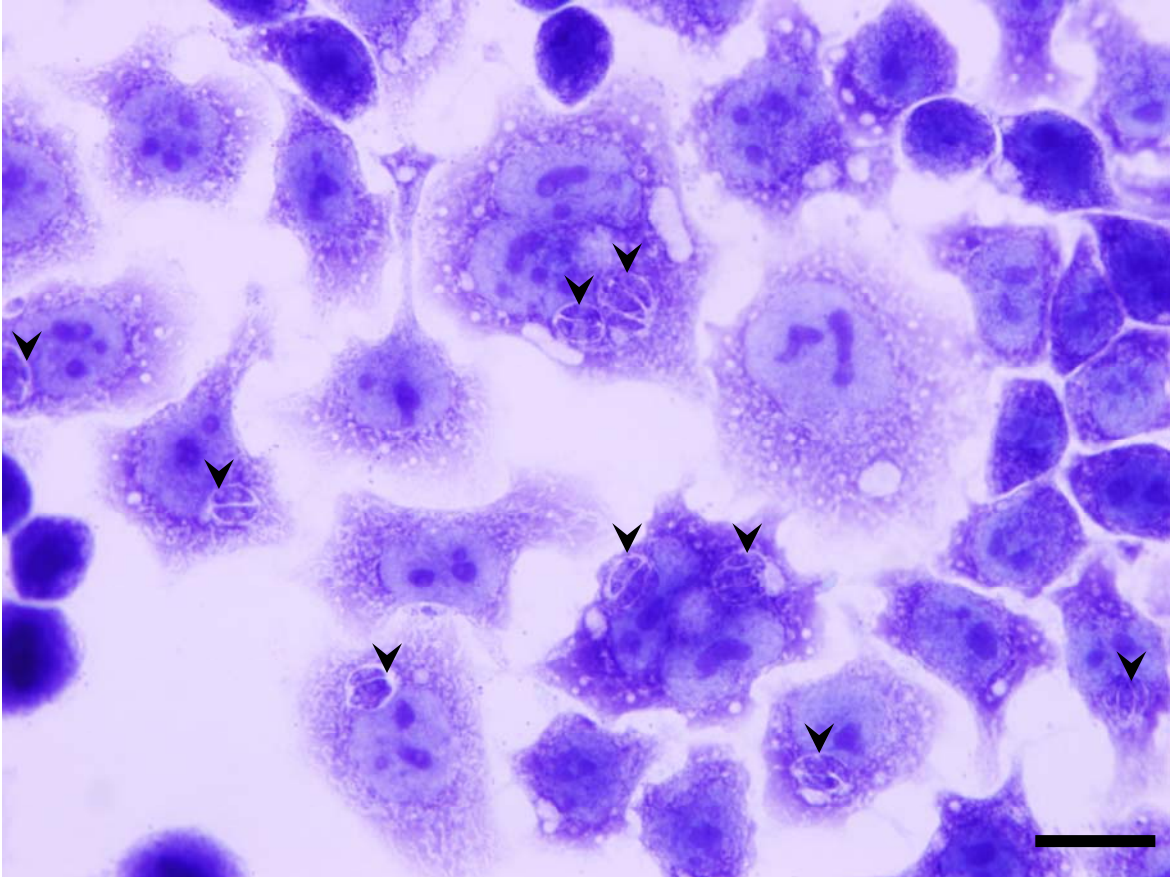


Figura 8. Fotomicrografia representativa de células BeWo não-tratadas e infectadas com *Neospora caninum*, analisadas após 24 h de infecção. As setas indicam os vacúolos parasitóforos contendo tachizoítos. Coloração com azul de toluidina. Escala da barra: 33 μ m.

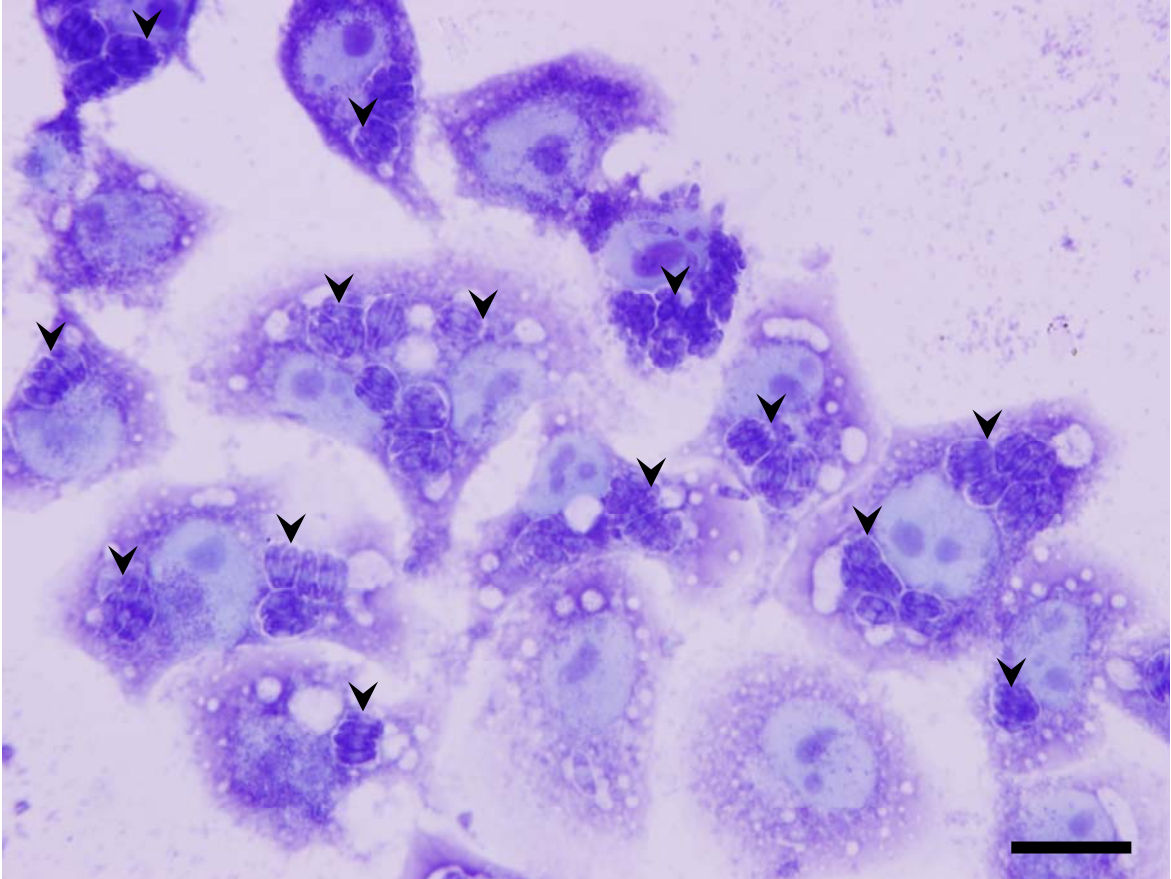


Figura 9. Fotomicrografia representativa de células HeLa não-tratadas e infectadas com *Neospora caninum*, analisadas após 24 h de infecção. As setas indicam os vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos. Coloração com azul de toluidina. Escala da barra: 33 μm .

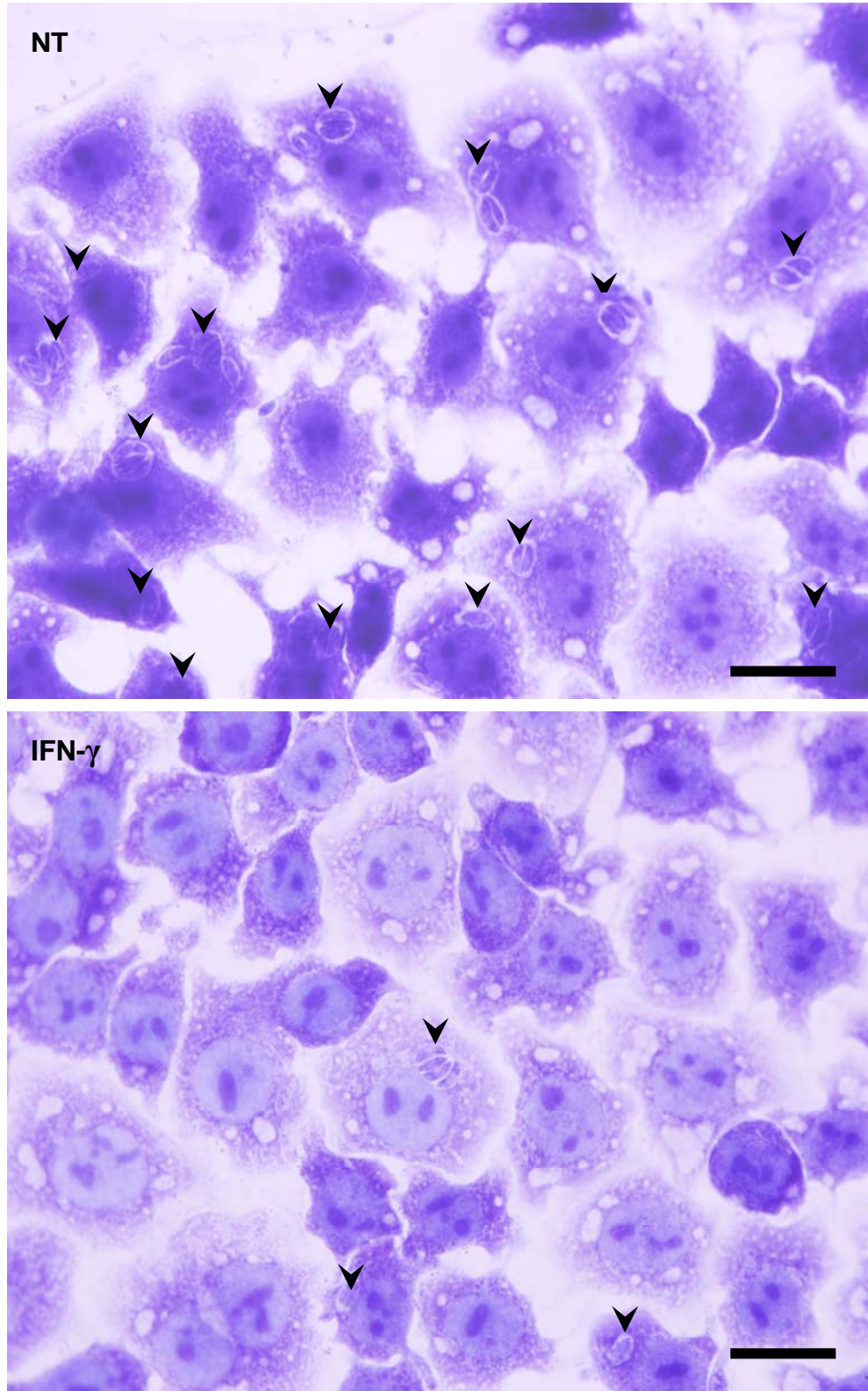


Figura 10. Fotomicrografias representativas de células BeWo infectadas com *Neospora caninum*, não-tratadas (NT) ou previamente tratadas com IFN-gama (IFN- γ), e analisadas após 24 h de infecção. As setas indicam os vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos, observando-se menor número de células infectadas quando tratadas com IFN- γ comparado às células não tratadas. Coloração com azul de toluidina. Escala da barra: 33 μ m.

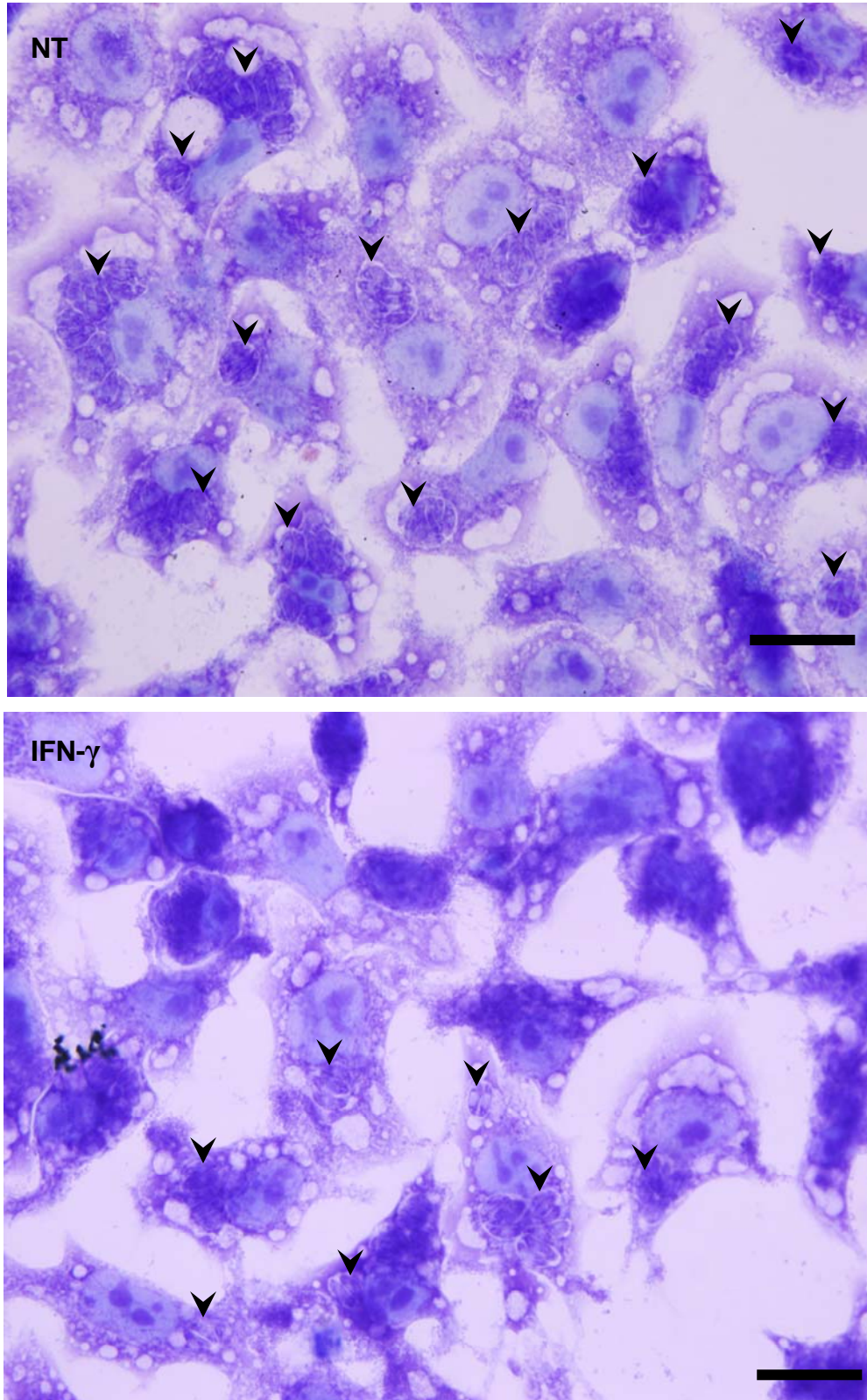


Figura 11. Fotomicrografias representativas de células HeLa infectadas com *Neospora caninum*, não-tratadas (NT) ou previamente tratadas com IFN-gama (IFN- γ), e analisadas após 24 h de infecção. As setas indicam os vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos, observando-se menor número de taquizoítos dentro dos vacúolos parasitóforos em células tratadas com IFN- γ comparado às células não tratadas. Coloração com azul de toluidina. Escala da barra: 33 μ m.

DISCUSSÃO

Durante a gestação, a defesa contra parasitos intracelulares como *T. gondii* e *N. caninum* representa um paradoxo devido à imunossupressão ou indução de tolerância aos tecidos fetais, sendo estes imprescindíveis para proteger o feto semialogeneico no útero, enquanto que a resposta imune pró-inflamatória Th1 é necessária para mediar a defesa protetora contra os parasitos (INNES et al., 2002).

Considerando que células trofoblásticas participam nos mecanismos da defesa imunológica inata na interface materno-fetal (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004) e não há dados disponíveis na literatura sobre o papel do trofoblasto humano interagindo com *N. caninum* nesta interface, foram analisados, no presente estudo, a susceptibilidade e perfil de citocinas das linhagens celulares do trofoblasto humano (células BeWo) comparado às linhagens do cérvix uterino humano (células HeLa) à infecção por este parasito.

Os resultados deste estudo demonstraram que células BeWo e HeLa são alvos potenciais para *N. caninum* e exibem diferencial susceptibilidade à infecção. Nas primeiras 48 horas de infecção e nas menores proporções de parasito:célula (2:1 e 5:1), o número de células viáveis foi maior em células BeWo que em HeLa, indicando que *N. caninum* induz diferencial viabilidade celular entre células BeWo e HeLa dependente de dose e tempo de infecção. Além disso, ambas as linhagens celulares infectadas apresentaram aumento no número de células viáveis em relação aos controles não-infectados, reforçando que a infecção parasitária aumenta a viabilidade celular de BeWo e HeLa nas primeiras horas de infecção. Após 72 horas de infecção, entretanto, a viabilidade celular foi acentuadamente diminuída com o aumento nas proporções de parasito:célula, sugerindo extensa lise celular de forma direta e dependente de dose e tempo de infecção.

Para confirmar estes dados, a lise celular foi posteriormente determinada pela mensuração da atividade de LDH após diferentes proporções e tempos de infecção por *N. caninum*. Os resultados mostraram maiores e crescentes concentrações de LDH, evidenciadas pela maior atividade da enzima, em sobrenadantes de células HeLa do que em BeWo, após 24 horas de infecção, que foram dependentes diretamente das proporções de parasito:célula, indicando maior lise em células HeLa do que em BeWo infectadas. Estes efeitos foram associados com a menor viabilidade das células HeLa comparado a BeWo nas primeiras horas de infecção,

como discutido acima. Com o avançar da infecção, entretanto, a atividade de LDH aumentou consideravelmente nas duas linhagens celulares, refletindo em aumento da lise celular devido à replicação intracelular parasitária.

Um estudo que analisou o efeito da infecção por *N. caninum* em astrócitos de rato em cultura primária, também mostrou que essas células responderam ativamente à infecção, como demonstrado pelo padrão hipertrófico e reorganização dos gliofilamentos nas primeiras 24 horas de infecção, bem como significativa liberação de LDH após 24 e 72 horas de infecção (PINHEIRO et al., 2006).

Analisando em conjunto os dados de viabilidade e lise celular, pode-se inferir que *N. caninum* aumenta a viabilidade celular nos momentos mais precoces de infecção, preferencialmente em células BeWo, sugerindo que a infecção pelo parasito pode ser capaz de inibir a morte de células e/ou induzir a proliferação celular nos tempos iniciais da infecção.

Muitos microrganismos patogênicos podem ser capazes de modular uma variedade de funções nas células hospedeiras para sua propagação e sobrevivência, incluindo a apoptose (ZYCHLINSKY; SANSONETTI, 1997; ANGELONI et al., 2009). Este processo de morte celular programada é importante para controlar respostas imunes em mamíferos e também para limitar o crescimento de patógenos (HEUSSLER; KUENZI; ROTTENBERG, 2001).

Um estudo prévio demonstrou que a apoptose é inibida em fibroblastos embrionários de camundongos cultivados e infectados com *N. caninum*, uma vez que as células infectadas foram refratárias à ativação do receptor de morte que medeia a apoptose e esta inibição foi associada com a diminuição de atividade de caspases (HERMAN et al., 2007). Estes achados indicam que *N. caninum* é capaz de impedir a apoptose de células hospedeiras e manter um estado anti-apoptótico *in vitro*. Em outro estudo, foi demonstrado que a permanência da célula hospedeira neste estado anti-apoptótico é importante para o parasito *T. gondii*, pois para se manter vivo ele necessita de nutrientes do hospedeiro, como arginina, triptofano, poliaminas, purinas, colesterol e ferro (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

Neste contexto, recentemente foi demonstrado que a apoptose e proliferação celular de ambas as linhagens de células BeWo e HeLa são diferentemente moduladas por cepas distintas de *T. gondii*, uma vez que ambas as linhagens celulares infectadas com a cepa RH apresentaram menor índice de apoptose que os controles não-infectados, enquanto um maior índice de apoptose foi encontrado em

células infectadas com a cepa ME49 (ANGELONI et al., 2009). Adicionalmente, os índices de proliferação celular foram maiores nas linhagens infectadas com ME49 quando comparados aos controles não-infectados e às células infectadas com a cepa RH. Estas diferenças podem estar associadas às estratégias de evasão do parasito ao sistema imune para manipular células do hospedeiro para sua sobrevivência intracelular, interferindo com diferentes vias moleculares, como a diferenciação celular, proliferação e apoptose (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

N. caninum é reconhecido como um protozoário que provoca aborto, principalmente em bovinos, mas o mecanismo pelo qual este parasito causa o aborto é ainda desconhecido e tem sido proposta uma patogênese mediada por mecanismos imunológicos (QUINN; ELLIS; SMITH, 2002). A resposta imune protetora a *N. caninum* em camundongos possui um perfil de citocinas Th1, com a produção de IL-12 e IFN- γ , sendo este perfil de resposta imune crítico para a sobrevivência do hospedeiro (BASZLER et al., 1999). Por outro lado, o sistema imunológico na gestação é modulado de forma que a expressão de citocinas do perfil Th2 seja predominante (RAGHUPATHY, 1997). Na infecção por *N. caninum* durante a gestação, a expressão de citocinas tipo Th1 e a deficiência de citocinas tipo Th2 na interface materno-fetal podem estar associadas com a perda fetal (ROSBOTTOM et al., 2008).

No presente estudo, a produção de citocinas por células trofoblásticas BeWo e cervicais uterinas HeLa, infectadas ou não com *N. caninum*, também foi avaliada sob diferentes condições de pré-tratamento celular. Os resultados mostraram que MIF foi espontaneamente secretado pelas duas linhagens celulares, embora com níveis mais elevados em BeWo do que em HeLa, após 48 horas de cultura, e a infecção por *N. caninum* foi capaz de induzir um significativo aumento nos níveis de MIF em ambas linhagens celulares. Este aumento de MIF foi visivelmente maior nas células HeLa do que em BeWo após 24 horas de infecção, particularmente quando as células foram pré-tratadas com NLA ou IFN- γ . Em contraste, os efeitos de NLA ou IFN- γ nas células BeWo após a infecção foram o oposto, com diminuição da produção de MIF após 48 horas de infecção. Estes dados indicam que a infecção por *N. caninum* induz regulação positiva na produção de MIF pelas células BeWo e HeLa, mas o pré-tratamento celular com NLA ou IFN- γ exerce um papel diferencial na produção e secreção de MIF em ambas as linhagens de células após a infecção.

MIF é uma citocina capaz de inibir a migração randômica de células

mononucleares *in vitro* e é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo trofoblasto fetal e útero materno (IETTA et al., 2007). Além disso, MIF é considerado um regulador essencial de respostas imunes e inflamatórias e é crítico para a defesa do hospedeiro contra vários parasitos intracelulares, incluindo *T. gondii* (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002; REYES et al., 2006; FLORES et al., 2008), através da retenção de macrófagos ativados, aumentando assim a atividade microbida das respostas imunes inatas (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002; McDEVITT et al., 2006; FLORES et al., 2008).

Em um estudo anterior, a produção e secreção de MIF por explantes de vilos humanos foram fortemente associadas à estimulação pelo antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) ou STAg associado com IFN- γ após 24 horas de cultura (FERRO et al., 2008). Em outro estudo, as células BeWo quando estimuladas com STAg e infectadas com *T. gondii* secretaram maior quantidade de MIF que as células não-infectadas e não-tratadas (GOMES, 2008). Além disso, o bloqueio de MIF endógeno resultou em maior susceptibilidade dessas células à infecção pelo parasito e o estímulo celular com MIF exógeno induziu proteção destas células contra a infecção por *T. gondii* (GOMES, 2008). Assim, esses resultados mostram que MIF pode estar envolvido na resistência de células trofoblásticas da linhagem BeWo à infecção por *T. gondii*.

Ao analisar a produção da citocina TGF- β foi observada maior produção espontânea de TGF- β em células BeWo que em HeLa e, após a infecção por *N. caninum*, foi notado um perfil oposto à secreção de MIF, no qual a secreção de TGF- β foi reduzida, principalmente nas células BeWo. O pré-tratamento celular com NLA ou IFN- γ diminuiu ainda mais os níveis de TGF- β em ambas as linhagens celulares após 24 horas de infecção. Estes resultados sugerem que a infecção por *N. caninum* induz regulação negativa na produção de TGF- β , principalmente em células BeWo, que é ainda mais acentuada com o pré-tratamento celular com NLA ou IFN- γ . Além disso, as células trofoblásticas possuem um metabolismo celular diferente das demais células, como as epiteliais uterinas, refletindo a situação de que o trofoblasto estabelece estratégias que possibilitam a manutenção do feto no organismo materno sem qualquer mecanismo de rejeição em gestação normal.

TGF- β é uma das citocinas que propicia um local imunologicamente privilegiado para o desenvolvimento fetal e que tem sido detectado em placentas humanas, inibindo as células produtoras de citocinas inflamatórias e células NK

(JONES et al., 2006). Em estudos anteriores, observou-se que a susceptibilidade de células BeWo a *T. gondii* foi aumentada após pré-tratamento com TGF- β em contraste com células HeLa, reforçando que o papel das células trofoblásticas na manutenção de um microambiente placentário favorável à gestação pode facilitar a infecção nos tecidos placentários (BARBOSA et al., 2008). Desta forma, estudos futuros semelhantes deverão ser conduzidos abordando ensaios de pré-tratamento das células BeWo e HeLa com MIF ou TGF- β seguido da infecção por *N. caninum* para clarificar o real papel destas citocinas na interface materno-fetal em neosporose.

Ao analisar os índices de infecção e replicação intracelular de *N. caninum*, no presente estudo, células HeLa foram acentuadamente mais susceptíveis à infecção por *N. caninum* que células BeWo, de forma semelhante ao que foi encontrado para a susceptibilidade dessas células a *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008). Estes resultados podem ser devido a uma característica peculiar das células BeWo que espontaneamente produzem maiores níveis de TGF- β que células HeLa.

O pré-tratamento celular com IFN- γ , no entanto, resultou em moderada, mas significativa diminuição na porcentagem de células infectadas em ambas as linhagens celulares, sugerindo um possível controle da infecção por *N. caninum* por esta citocina, inibindo a invasão do parasito às células vizinhas e, conseqüentemente, controlando a sua disseminação. Estes efeitos também foram observados com *T. gondii* e células HeLa somente, enquanto o efeito oposto foi observado em células BeWo, no qual o tratamento com IFN- γ foi capaz de aumentar a susceptibilidade a *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008). Em outro estudo comparando as duas linhagens celulares frente à infecção por *T. gondii*, os resultados mostraram que células BeWo foram mais susceptíveis a *T. gondii* e foram incapazes de controlar a replicação do parasito, mesmo na presença de IFN- γ exógeno (OLIVEIRA et al., 2006). Estes resultados contraditórios podem estar relacionados com diferenças nas doses de IFN- γ e protocolos experimentais dos diferentes estudos. Assim, usando doses consideravelmente mais baixas de IFN- γ no presente estudo, foi demonstrado que a infecção por *N. caninum* em células BeWo e HeLa poderia ser parcialmente controlada por mecanismos mediados por IFN- γ .

Outra possível explicação para os resultados contraditórios pode estar relacionada com as características peculiares de cada parasito. Neste contexto, já foi demonstrado que *T. gondii* e *N. caninum* exibem consideráveis diferenças quanto ao

conteúdo de carboidratos na superfície dos taquizoítos (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006). Desta forma, Fuchs e colaboradores (1999) demonstraram a presença de carboidratos na superfície de taquizoítos de *N. caninum* e a ausência de glucanas na superfície de *T. gondii*, pela utilização de um painel de lectinas para a identificação de glicoproteínas associadas à superfície dos taquizoítos. Assim, os autores mostraram que Concanavalina A (ConA) corou a superfície de taquizoítos de *N. caninum*, mas não de *T. gondii* e os sítios de ligação de ConA foram localizados na superfície e nos grânulos densos de taquizoítos de *N. caninum* (FUCHS et al., 1999). Portanto, as modificações pós-traducionais de carboidratos nas proteínas antigênicas (glicosilações) poderiam potencialmente ter implicações na interação parasito-hospedeiro, especialmente com o mascaramento de epítomos (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006).

Além disso, *N. caninum* e *T. gondii* diferem com relação à susceptibilidade a inibidores de proteases (NAGULESWARAN; MÜLLER; HEMPHILL, 2003). Os autores observaram em análises comparativas de invasão de células hospedeiras que a invasão de *T. gondii* é diminuída por inibidores de serina-proteases (PMSF), enquanto os inibidores de serina-, metalo- e cisteína-proteases não afetaram a invasão de *N. caninum*, a qual teve um profundo impacto apenas com os inibidores de aspartil-proteases (pepstatina). Outro aspecto diferencial entre *N. caninum* e *T. gondii* refere-se à ligação dos taquizoítos com os receptores de superfície na célula hospedeira, especialmente as glicosaminoglicanas (GAGs). Enquanto taquizoítos de *N. caninum* ligam-se preferencialmente às GAGs com sulfato de condroitin, taquizoítos de *T. gondii* interagem principalmente com resíduos de sulfato de heparina (NAGULESWARAN et al. 2002).

Analisando conjuntamente, estes resultados sugerem que *N. caninum* e *T. gondii*, embora estreitamente relacionados, parecem induzir diferentes mecanismos de invasão e estratégias de evasão em células trofoblásticas e epiteliais uterinas.

Sabe-se que IFN- γ é uma das mais importantes citocinas envolvidas no controle da infecção por *N. caninum* por inibir a multiplicação intracelular do parasito (INNES et al., 1995). Entre os mecanismos de defesa inata aos parasitos intracelulares, estão os mecanismos oxidativos como a indução de oxigênio reativo (MURRAY; COHN, 1979; HUGHES, 1988), mecanismos não-oxidativos como a produção de monóxido de nitrogênio (NO) por macrófagos ativados por IFN- γ (ADAMS et al., 1990), e a indução por IFN- γ da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase

(IDO) que degrada o triptofano, necessário para o crescimento do parasito (PFEFFERKORN; REBHUN; ECKEL, 1986).

Como os resultados do presente estudo não mostraram níveis detectáveis de nitrito em todas as condições analisadas, os efeitos do pré-tratamento celular com IFN- γ sobre a infecção e replicação de *N. caninum* não poderiam estar relacionados com a produção de NO. Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos investigando a susceptibilidade de células BeWo e HeLa a *T. gondii* (OLIVEIRA et al., 2006).

Assim, um provável controle do parasitismo de *N. caninum*, particularmente em células HeLa que mostraram índices de replicação parasitária significativamente diminuídos após tratamento com IFN- γ , poderia estar relacionado com a ativação da IDO. Sabe-se que IFN- γ é capaz de ativar a enzima IDO que apresenta fundamental importância no metabolismo celular por apresentar a propriedade de degradar L-Triptofano, aminoácido essencial para o crescimento do parasito (PFEFFERKORN; REBHUN, ECKEL, 1986). O composto 1- α -Metil-Triptofano é um inibidor competitivo da enzima IDO, deixando o L-Triptofano livre para ser incorporado às proteínas do parasito, exercendo assim, ação benéfica ao crescimento do parasito (OLIVEIRA et al., 2006).

Para verificar se o controle da replicação intracelular de *N. caninum* em células HeLa é dependente da IDO induzida por IFN- γ , foram realizados ensaios experimentais de pré-tratamentos celulares com IFN- γ e/ou 1-MT e/ou TRIP, seguido por infecção pelo parasito. Foi observado que o pré-tratamento celular com o inibidor 1-MT ou com TRIP na presença de IFN- γ nas duas concentrações testadas (10 e 100 ng/mL) aumentou significativamente os índices de replicação parasitária em relação às células tratadas somente com IFN- γ , indicando uma reversão do efeito de IFN- γ na inibição do crescimento do parasito. Desta forma, foi demonstrado que células epiteliais uterinas humanas (HeLa) estimuladas por IFN- γ são capazes de inibir a replicação intracelular de *N. caninum* por mecanismo dependente de IDO. De acordo com estes achados, um estudo recente mostrou que a indução da IDO mediada por IFN- γ foi o mecanismo responsável pela inibição do crescimento de *N. caninum* em células endoteliais e fibroblastos bovinos (SPEKKER et al., 2009).

Estes ensaios de inibição da IDO foram realizados apenas com células HeLa, uma vez que Entrican e colaboradores (2002) verificaram que células BeWo não expressam a enzima IDO constitutivamente, porém apresentam receptores para IFN-

γ . Após infecção com *Chlamydomphila abortus*, esses autores verificaram que células BeWo não conseguem deter o crescimento desta bactéria, mesmo sob tratamento com IFN- γ , refletindo um diferente controle imunológico a patógenos na interface materno-embriônica.

Um mecanismo alternativo poderia estar envolvido na participação de MIF, uma vez que a infecção por *N. caninum* e o pré-tratamento celular com NLA ou IFN- γ foram capazes de regular positivamente e precocemente a produção de MIF em ambas as linhagens celulares, particularmente em células HeLa. Estudos anteriores demonstraram que MIF é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, que também foram reguladas positivamente durante a infecção de células humanas com *T. gondii*, e ICAM-1, por sua vez pode se ligar a monócitos ativados por antígenos ou parasitos (PFEFFERKORN; REBHUN; ECKEL, 1986). Portanto, MIF pode também desempenhar papel relevante na resposta imune a *N. caninum* no microambiente placentário.

Em uma análise global, nossos resultados demonstraram pela primeira vez que células trofoblásticas humanas (BeWo) e cervicais uterinas (HeLa) são alvos potenciais para o parasito *N. caninum*, embora apresentando diferenças na susceptibilidade à infecção, produção de citocinas, viabilidade e lise celular. Após a infecção, células HeLa foram mais permissivas ao parasito, MIF foi regulado positivamente, principalmente em células HeLa, enquanto TGF- β foi regulado negativamente, principalmente em células BeWo, e o aumento precoce da viabilidade celular foi observado em células BeWo, refletindo em diferentes estratégias utilizadas pelo parasito para a sobrevivência dentro das células hospedeiras. O IFN- γ foi uma citocina potencial para controlar a infecção por *N. caninum* em células trofoblásticas e epiteliais uterinas humanas, sendo que o controle do crescimento parasitário foi mediado por IFN- γ por mecanismo dependente de IDO somente em células HeLa, comprovando que células humanas podem usar mecanismos efetores semelhantes às descritas em células de bovinos para controlar a infecção por *N. caninum*.

7 CONCLUSÕES

- Células trofoblásticas humanas (BeWo) e cervicais uterinas (HeLa) representam alvos potenciais como células hospedeiras ao parasito *N. caninum*, embora apresentem diferenças na susceptibilidade à infecção;
- *N. caninum* induz diferencial viabilidade e lise celular em células BeWo e HeLa de maneira dose e tempo-dependente, com aumento na viabilidade de células BeWo e maior lise em células HeLa após infecção precoce;
- Produção de MIF e TGF- β é diferencialmente modulada após infecção por *N. caninum* em células BeWo e HeLa, com MIF sendo regulado positivamente em células HeLa e TGF- β regulado negativamente em células BeWo;
- Infecção e replicação intracelular de *N. caninum* são maiores em células HeLa que BeWo e diminuem após pré-tratamento celular com IFN- γ ;
- Redução dos índices de replicação intracelular de *N. caninum* em células HeLa pré-tratadas com IFN- γ é dependente da ativação de IDO.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, V.M.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 51, n. 4, p. 275-282, 2004.
- ADAMS, L. B.; HIBBIS JUNIOR, J. B.; TAINTOR, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 144, n. 7, p. 2725-2729, 1990.
- ALVES, C. M. O. S.; SILVA, D. A. O.; AZZOLINI, A. E. C. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; CARVALHO, J. V.; PAJUABA, A. C. A. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; CHAMMAS, R.; LIU, F.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MINEO, J. R. Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. **Immunobiology**, Amsterdam, doi:10.1016/j.imbio.2009.08.001, 2009.
- AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G. S.; CORRÊA, S. T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, Cambridge, v.128, n.2, p.207–218, 2004.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A.. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 417-431, 2000.
- ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; CASTRO, A. S.; GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Apoptosis and S Phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, London, v.30, n.9, p.785–791, 2009.
- APTE, R. S.; SINHA, D.; MAYHEW, E.; WISTOW, G. J.; NIEDERKORN, J. Y. Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, n. 12, p. 5693-5696, 1998.
- ARCURI, F.; CINTORINO, M.; VATTI, R.; CARDUCCI, A.; LIBERATORI, S.; PAULESU, L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. **Biology of Reproduction**, New York, v. 60, n. 6, p. 1299-1303, 1999.
- ARCURI, F.; BUCHWALDER, L.; TOTI, P.; CINTORINO, M.; TOSI, P.; LOCKWOOD, C. J.; RYBALOV, B.; SCHATZ, F. Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface **Biology of Reproduction**, New York, v. 76, n. 3, p. 433-439, 2007.
- BANNENBERG, G. L.; ALIBERTI, J.; HONG, S.; SHER, A.; SERHAN, C. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, n. 4, p. 515-523, 2004.

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

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, New York, v. 71, n. 2, p. 236-242, 1994.

BASZLER, T. V.; LONG, M. T.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 29, n. 10, p.1635–1646, 1999.

BENNETT, W. A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; WHITWORTH, N. S.; BRACKIN, M. N.; HALE, E.; COWAN, B. D. Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. **Early Pregnancy : biology and medicine : the official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy**, New York, v. 3, n. 3, p. 190-198, 1997.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; MITCHELL, R. A.; MARTIN, S. B.; TRACEY, K. J.; VOELTER, W.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, London, v. 365, n. 6448, p. 756-759, 1993.

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

BJÄRKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 1, p. 3-9, 1998.

BOWEN, J. M.; CHAMLEY, L.; MITCHELL, M. D.; KEELAN, J. A. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. **Placenta**, London, v.23, n.4, p. 239-256, 2002.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 4, p.535-544, 2006.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; SPIEGEL, L. A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as glucocorticoid-induced counter-regulator of cytokine production. **Nature**, London, v. 377, n. 6544, p. 68-71, 1995.

CHSAVANEEYAKORN, S.; MOORE, J. M.; OTHORO, C.; OTIENO, J.; CHAIYAROJ, S. C.; SHI, Y. P.; NAHLEN, B. L.; LAL, A. A.; UDHAYAKUMAR, V. Immunity to placental malaria IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 9, p. 1371-1375, 2002.

CHURCH, H. J.; APLIN, J. D. BeWo choriocarcinoma cells produce laminin 10. **The Biochemical Journal**, London, v. 332, n. 2, p. 491-498, 1998.

CLARK, D. A.; ARCK, P. C.; CHAOUAT, G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 41, n. 1, p. 5-22, 1999.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAÚJO, F. R.; McALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 38, n. 2, p. 157-159, 2008.

DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 163-168, 2001.

DRAKE, B. L.; HEAD, J. R. Murine trophoblast cells can be killed by lymphokine activated killer (LAK) cells. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, n. 1, p. 9-14, 1989.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and the experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 349-367, 1999.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJÖRKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; McALLISTER, M. M., MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 473-483, 2005.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 20, n. 2, p. 323–367, 2007.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A.M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, n. 2 v. 64, p. 303-311, 1994.

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

ENTRICAN G, WATTEGEDERA S, CHUI M, OEMAR L, ROCCHI M, MCINNES C. Gamma interferon fails to induce expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and does not control the growth of *Chlamydomphila aboutus* in BeWo trophoblast cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 5, p. 2690-2693, 2002.

FERRO, E. A.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MORTARA, R. A., MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 8-9, p. 647–654, 1999.

FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 2000. 147f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

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

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

FUCHS, N.; BÜTIKOFER, P.; SONDA, S.; HEMPHILL, A. Detection of surface-associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1597-1611, 1999.

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukine (IL)-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, London, v. 21, n. 4, p. 354-360, 2000.

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

GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; PITTI, W. C.; ZEMLIKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GRAHAM, D. A.; CALVERT, V.; WHYTE, M.; MARKS, J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. **The Veterinary Record**, London, v. 144, n. 24, p. 672-673, 1999.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 126, n. 1, p.131-138, 1982.

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

HALDORSON, G. J.; STANTON, J. B.; MATHISON, B. A.; SUAREZ, C. E.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum*: antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. **Experimental Parasitology**, New York, v. 112, n. 3, p. 172-178, 2006.

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, London, v. 43, n. 1, p. 47-104, 1999.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 29, n. 8, p. 1175-1188, 1999.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, London, v. 133, n. 3, p. 261-278, 2006.

HERMAN, R. K.; MOLESTINA, R. E.; SINAI, A. P.; HOWE, D. K. The apicomplexan pathogen *Neospora caninum* inhibits host cell apoptosis in the absence of discernible NF- κ B activation. **Infection and Immunity**, Washington, v.75, n.9, p.4255–4262, 2007.

HEUSSLER, V. T; KUENZI, P.; ROTTENBERG, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 31, n. 11, p.1166–1176, 2001.

HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 4, n. 12, p. 340-347, 1988.

HUNTER, C.; CANDOLFI, E.; SUBAUSTE, C.; VAN CLEAVE, REMINGTON, J.; Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunology**, Oxford, v. 84, n.1, p. 16-20, 1995.

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

INNES, E. A.; PANTON, W. R.; MARKS, J.; TREES, A. J.; HOLMDHAL, J.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 113, n. 1, p. 95-100, 1995.

INNES, E. A.; ADRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

JONES, R. L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J. K.; SALAMONSEN, L. A. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 217–232, 2006.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; KAKIRMAN, H.; STASSEN, M.; KNOP, J.; ENK, A. H. Infectious Tolerance: Human CD25⁺ Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional CD4⁺ T Helper Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 196, n. 2, p. 255-260, 2002.

KHAN, I. A.; SMITH, K. A.; KASPER, L. H. Induction of antigen specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 85, n. 6, p. 1639-1649, 1994.

KHAN, I. A., SCHWARTZMAN, J. D., FONSEKA, S., KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, New York, v. 85, n. 1, p. 24–34, 1997.

KIDD, P. TH1/TH2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 8, n. 3, p. 223-246, 2003.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Science**, Boston, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008.

LEI, Y.; DAVEY, M.; ELLIS, J. T. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. **Parasitology**, London, v. 131, n. 5, 583-590, 2005.

LIN, H.; MOSMANN, T. R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPIPAT, S.; WEGMANN, T. G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 9, p. 4562-4573, 1993.

LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W.; AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington DC, v. 13, n.1, p. 84-89, 2006.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 4, p. 608–611, 1996.

LOWRY, O. H.; ROSENBOROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, n.1, p.265–75, 1951.

LUCISANO-VALIM, Y. M.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; SILVA, S. C.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MANTOVANI, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v.47, n.1, p.53–58, 2002.

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

MACHADO, R. Z.; MINEO, T. W. P.; LANDIM, L. P.; CARVALHO, A. F.; GENNARI, S. M.; MIGLINO, M. A. Possible role of bovine trophoblast giant cells in transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.16, n.1, p.21-25, 2007.

- MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, Lawrence , v. 84, n. 5, p. 983-991, 1998.
- McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.
- McDEVITT, M. A.; XIE, J.; SHANMUGASUNDARAM, G.; GRIFFITH, J.; LIU, A.; MCDONALD, C.; THUMA, P.; GORDEUK, V. R.; METZ, C. N.; MITCHELL, R.; KEEFER, J.; DAVID, J.; LENG, L.; BUCALA, R. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.203, n.5, p.1185–1196, 2006.
- MILLS, K. H. G.; McGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 16, n. 2, p. 107-117, 2004.
- MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.
- MINERVINO, A. H. H.; RAGOZO, A. M. A.; MONTEIRO, R. M.; ORTOLANI, E. L.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 254-256, 2008.
- MORAES-PINTO, M. I.; VINCE, G. S.; FLANAGAN, B. F.; HART, C. A.; JOHNSON, P. M. Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes. **Immunology**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 87-94, 1997.
- MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, Berlin, v. 100, n. 3, p. 633-636, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.
- MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. Macrophage oxygen-dependent anti-microbial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 150, n. 4, p. 938-949, 1979.

NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N.; BJORKMAN, C.; HEMPHILL, A. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC3 mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 695-704, 2002.

NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite–host cell interactions. **Experimental Parasitology**, New York, v. 104, n. 3-4, p. 149-158, 2003.

NAM, H.; KANG, S.; CHOI, W. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

NEURATH, M. F.; WEIGMANN, B.; FINOTTO, S.; GLICKMAN, J.; NIEUWENHUIS, E.; IJIMA, H.; MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; MUDTER, J.; GALLE, P. R.; BHAN, A.; AUTSCHBACH, F.; SULLIVAN, B. M.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H.; BLUMBERG, R. S. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, n. 9, p.1129-1143, 2002.

NORWITZ, E. R.; SCHUST, D. J.; FISHER, S. J. Implantation and the survival of early pregnancy. **The New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 345, n. 19, p. 1400-1408, 2001.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A. D.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R. M.; FERRO, E. A. V. BeWo Trophoblasts are Unable to Control Replication of *Toxoplasma gondii*, Even in the Presence of Exogenous IFN- γ . **Placenta**, London, v. 27, n. 6-7, p. 691-698, 2006.

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

PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JENSEN, L.; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.

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

PFUFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, A.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. **Parasitology**, New York, v. 134, pt. 13, p. 1895-902, 2007.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine-2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultures human fibroblasts. **Journal of Interferon Research**, New York, v.6, n.3, p.267-279, 1986.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A. O.; TARDY, M.; EL BACHÁ, R.; COSTA, M. F. D. *Neospora caninum*: Infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. **Experimental Parasitology**, New York, v. 112, n. 3, p. 193-197, 2006.

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p.391–394, 2002.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 18, n. 10, p. 478–482, 1997.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1 / Th2 / Th3 paradigm. **Springer Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 13, n. 4, p. 219-227, 2001.

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

RIBEIRO, D. P.; FREITAS, M. M. P.; CARDOSO, M. R. D.; PAJUABA, A. C. A. M.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; SILVA, J. J.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, n. 19, p. 2570-2579, 2009.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E. H.; GUY, C. S.; KIPAR, A.; SMITH, R. F.; KAISER, P.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 6, p. 2352–2361, 2008.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 87-103, 2000.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 75, n. 1-2, p. 73-94, 2003.

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

- SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.
- SIMON, C.; CABALLERO-CAMPO, P.; GARCÍA-VELASCO, J. A.; PELLICER, A. Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 169-193, 1998.
- SPEKKER, K.; CZESLA, M.; INCE, V.; HESELER, K.; SCHMIDT, S. K.; SCHARES, G.; DÄUBENER, W. Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in the defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.77, n.10, p.4496-4501, 2009.
- STULC, J. Intracellular transport pathways in the haemochorial placenta. **Placenta**, London, v. 10, n. 1, p. 113-119, 1989.
- SUGUITAN JR, A. L.; SUGUITAN, A. L.; LEKE, R. G.; FOU DA, G.; ZHOU, A.; THUITA, L.; METENOU, S.; FOGAKO, J.; MEGNEKOU, R.; TAYLOR, D. W. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 188, n. 7, p. 1074-1082, 2003.
- TANAKA, T.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. **Parasitology Research**, Berlin, v. 86, n. 9, p. 768-771, 2000.
- TAKEUCHI, M.; ALARD, P.; STREILEIN, J. W. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, n. 4, p. 1589-1597, 1998.
- THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis – like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 1, n. 3, p. 205-209, 1989.
- TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; McALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.
- TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.
- TSUI, K. H.; CHEN, L.Y.; SHIEH, M. L.; CHANG, S. H.; YUAN, C. C.; LI, H.Y. Interleukin-8 can stimulate progesterone secretion from a human trophoblast cell line, BeWo. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, Berlin, v. 40, n. 10, p. 331-336, 2004.

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

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, Amsterdam, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.

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

ZOURBAS, S. Localization of pro-inflammatory (IL-12, IL-15) and anti-inflammatory (IL-11, IL-13) cytokines at the foetomaternal interface during murine pregnancy. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 126, n. 3, p. 519-528, 2001.

ZYCHLINSKY, A.; SANSONETTI, P. J. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 5, p. 201-204, 1997.



ANEXO A

Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131
 e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 476/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 218/09

Projeto Pesquisa: Avaliação da suscetibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem Be Wo) e epiteliais uterinas (linhagem Hela) à infecção por Neospora caninum.

Pesquisador Responsável: Deise Aparecida de Oliveira

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

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

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

Data de entrega do relatório final: março de 2010.

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

Uberlândia, 25 de setembro de 2009.

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

Orientações ao pesquisador

- O sujeito 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 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- 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 Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) 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 Item V.4). 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). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista.