

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JANICE BUIATE LOPES MARIA

Modulação da apoptose em células BeWo infectadas por cepas atípicas
(Udi1CH-05 e Udi2CH-05) de *Toxoplasma gondii*

Uberlândia

2013

JANICE BUIATE LOPES MARIA

Modulação da apoptose em células BeWo infectadas por cepas atípicas
(Udi1CH-05 e Udi2CH-05) de *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia da Reprodução

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M332m Maria, Janice Buiate Lopes, 1987-
2013 Modulação da apoptose em células BeWo infectadas por cepas atípicas (Udi1CH-05 e Udi2CH-05) de *Toxoplasma gondii* / Janice Buiate Lopes Maria. -- 2013.
73 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Coorientador: José Roberto Mineo..

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Apoptose - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela minha saúde e proteção, pela oportunidade de ter uma família amorosa, amiga e companheira.

Muito obrigada aos meus pais Helenice e Joaquim pelo incentivo constante e não me deixarem desistir, por me ensinarem o valor dos estudos, pela educação, dedicação, disposição e amor sem medidas.

Obrigada à vovó Eurides, pelas palavras de sabedoria e experiência sempre acompanhadas de muita alegria.

Agradeço à minha irmã Joyce e meu cunhado Fernando, por estarem sempre ao meu lado, pela amizade, pelos momentos de descontração e de apoio sempre que precisei.

Muito obrigada à minha sobrinha e afilhada Sabrina, pelo sorriso sempre estampado em seu rostinho, me mostrando que nenhuma preocupação permanece diante da felicidade.

À família do meu esposo, agradeço pelo incentivo e apoio durante o curso. Ao meu esposo Marco Aurélio, muito obrigada pelo companheirismo, atenção e compreensão. Agradeço ainda por manter junto comigo a esperança de que tudo daria certo.

Muito obrigada...

É com muito amor e carinho que dedico este trabalho a todos vocês!!!

Agradecimentos

Obrigada à professora Eloisa pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisas, pela confiança em meu trabalho e por sempre ensinar a dedicação necessária para a realização de um projeto.

Obrigada ao professor José Roberto Mineo pelo exemplo de profissionalismo e pela disponibilidade constante em ajudar na execução do trabalho.

Agradeço à Mariana, sempre muito amiga e disposta a me ajudar, obrigada pelos conselhos e sugestões visando sempre o melhor resultado para o trabalho.

Obrigada à Pâmela, prima e amiga que tanto me auxiliou na execução do trabalho, mostrando muita dedicação e empenho.

Obrigada à Mayara e à Priscila, que todo o tempo me ajudaram na condução da pesquisa, me incentivaram e ensinaram que diante de obstáculos não devemos desistir, e sim persistir.

Agradeço à Bellisa e à Angelica, pois estiveram sempre presentes demonstrando amizade em cada sugestão e em cada palavra de apoio.

Muito obrigada à Karine, Celene, Letícia, Andressa, Rafaela, Alessandra, Thaís, Ariane, Marcos Paulo, Rafael e todos os amigos da Histologia pelas brincadeiras e risos, mas também agradeço pelos momentos sérios e de trabalho em conjunto.

Agradeço às profissionais da limpeza, Dona Terezinha e Rizônia, pelo exemplo de alegria e esforço de trabalho.

Obrigada aos técnicos Fabrício, Ester, Rosiane, Eliete e Mariani, e às secretárias Juscélia, Giselda e Lilian pela disposição verdadeira em ajudar.

Obrigada à CAPES, Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

"Amanhecendo, começa o teu dia com alegria
renovada e sem passado negativo, enriquecido
pelas experiências que te constituirão recurso
valioso para a vitória que buscas."

(Joanna de Ângelis)

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que apresenta diferentes tipos de cepas e graus variados de virulência. As cepas são classificadas como clonais e cepas exóticas ou atípicas. Este parasito apresenta diversos mecanismos de evasão, o que garante o sucesso na replicação na célula hospedeira e, entre estes mecanismos, destaca-se habilidade de modular a apoptose tanto de células infectadas quanto de células presentes no microambiente da infecção. O presente trabalho objetivou avaliar a habilidade de duas cepas atípicas de *T. gondii* (Udi1CH-05 e Udi2CH-05) em modular a apoptose de células BeWo, a susceptibilidade destas células a este parasito, bem como a influência de tais cepas no padrão de secreção de citocinas por esta linhagem de células trofoblásticas. Estes parâmetros foram avaliados sob a perspectiva da procedência imediata das cepas oriundas diretamente de cultura celular ou oriundas de animais e mantidas por curto período em cultura (aqui denominada *Calomys callosus*/cultura). A categoria cultura de Udi1CH-05 modulou positivamente a apoptose a partir de 12 horas de infecção, e a partir de 2 horas de infecção por Udi2CH-05, categoria cultura a apoptose não foi controlada em células BeWo. A condição *C. callosus*/cultura de ambas as cepas não controlou a apoptose quando comparado ao controle não infectado. As células BeWo infectadas com Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura produzem altos níveis de IL-12 nos estágios iniciais da infecção, sugerindo o desencadeamento de resposta inflamatória típica. Os níveis de TNF- α foram maiores nos estágios iniciais de infecção e com diminuição gradativa de produção, coincidindo com incapacidade em induzir a apoptose quando células BeWo foram infectadas por Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura. Os níveis de IL-10 encontrados durante a infecção de células BeWo por Udi1CH-05, indicam que outras citocinas podem estar envolvidas no controle da infecção, enquanto que essa citocina atua no controle da resposta imune desencadeada pela infecção de células BeWo por Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura. A produção de TGF- β detectada mediante a infecção por Udi1CH-05 *C. callosus*/cultura ou por Udi2CH-05 de ambas as categorias, demonstra que essa citocina atua na imunorregulação de células infectadas, enquanto que a infecção por Udi1CH-05, categoria cultura sugere que outras citocinas anti-inflamatórias possam participar da imunorregulação, pois o aumento do índice de apoptose coincidiu com a diminuição da produção de TGF- β .

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Apoptose. Cepas atípicas.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that presents different strain types and degrees of virulence. The strains are classified like clonal or typical and exotic or atypical. This parasite presents several evasion mechanisms, which guarantees the successful replication in the host cell and, between these mechanisms, there is ability to modulate apoptosis of infected cells as well of cells in the microenvironment of infection. The present work aimed to evaluate the ability of two atypical strains of *T. gondii* (Udi1CH-05 and Udi2CH-05) on modulation of apoptosis in BeWo cells, the susceptibility of these cells by infection, as well as the influence of those strains on the standard of secretion of cytokines by the trophoblastic cells lineage. These parameters were evaluated from the perspective of the immediate origin of the strains derived directly from cell culture or from animals and maintained for a short period in culture (here called *Calomys callosus* / culture). The Udi1CH-05 culture category upregulated apoptosis from 12 hours post infection, and from 2 hours of infection by Udi2CH-05, culture category, apoptosis was uncontrolled in BeWo cells. The condition *C. callosus* / culture of both strains didn't control apoptosis when compared to uninfected control. BeWo cells infected with Udi2CH-05, *C. callosus* / culture category produce high levels of IL-12 in the early stages of infection, suggesting a typical inflammatory response. Levels of TNF- α were higher in the early stages of infection and with a gradual decrease production, coinciding with failure to induce apoptosis when cells were infected BeWo Udi2CH-05, *C. callosus* / culture category. The levels of IL-10 found during infection of BeWo cells by Udi1CH-05 indicate that other cytokines may be involved in the control of infection, whereas this cytokine acts in controlling the immune response induced by infection of cells by BeWo Udi2CH-05, *C. callosus* / culture category. The production of TGF- β detected by infection Udi1CH-05 *C. callosus* / culture or Udi2CH-05 of both categories, shows that this cytokine acts in the immunoregulation of infected cells, whereas infection by Udi1CH-05, culture category, suggests that other anti-inflammatory cytokines can participate in immunoregulation, since the increase the apoptosis rate coincided with the decreased production of TGF- β .

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Apoptosis. Atypical strains.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do ciclo de vida e <i>Toxoplasma gondii</i>	17
Figura 2: Esquema das principais vias de sinalização da apoptose.....	28
Figura 3: Esquema da interferência de <i>T. gondii</i> na apoptose de células hospedeiras.....	32
Figura 4: Índice de apoptose e fotomicrografias de células BeWo infectadas por Udi1CH-05.....	41
Figura 5: Índice de apoptose e fotomicrografias de células BeWo infectadas por Udi2CH-05.....	42
Figura 6: Índice de infecção de células BeWo infectadas por Udi1CH-05 ou Udi2CH-05.....	44
Figura 7: Número de parasitos por célula quando infectadas por Udi1CH-05 e Udi2CH-05.....	46
Figura 8: Detecção de IL-12.....	47
Figura 9: Detecção de TNF- α	48
Figura 10: Detecção de IL-10.....	49
Figura 11: Detecção de TGF- β	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e interação parasito-hospedeiro.....	13
2.2. O ciclo de vida.....	15
2.3. A toxoplasmose.....	17
2.4. A resposta imune a <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2.5. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
2.6. Apoptose.....	24
2.7. Apoptose, <i>Toxoplasma gondii</i> e a gestação.....	29
2.8. Objetivos.....	33
2.8.1. Objetivo geral.....	33
2.8.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Manutenção de células BeWo.....	34
3.2. Manutenção das cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05.....	34
3.2.1. Categoria cultura.....	34
3.2.2. Categoria <i>C. callosus</i> /cultura.....	35
3.3. Condição experimental.....	35
3.3.1. Determinação do índice de apoptose.....	36
3.3.2. Determinação do índice de infecção e do número de parasitos por célula.....	36
3.4. Detecção da produção de citocinas.....	37
3.4.1. Interleucina 12 (IL-12).....	37
3.4.2. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	37
3.4.3. Interleucina 10 (IL-10).....	38
3.4.4. Fator de crescimento transformante beta (TGF- β).....	38
3.5. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Udi1CH-05 e Udi2CH-05 modulam diferentemente a apoptose em células BeWo.....	40
4.2. Alteração da susceptibilidade de células BeWo à cepa Udi2CH-05 de acordo com o tempo de infecção.....	43

4.3. O número de parasitos por célula é maior em estágios tardios de infecção pela cepa Udi1CH-05.....	45
4.4. Interleucina-12 é produzida em altos níveis em estágios iniciais e intermediários da infecção por Udi2CH-05.....	47
4.5. Altos níveis de TNF-α são secretados nos estágios iniciais da infecção por Udi2CH-05.....	48
4.6. A infecção por <i>T. gondii</i> induz a secreção de IL-10 por células BeWo.....	49
4.7. A produção de TGF-β é modulada negativamente pela infecção por Udi1CH-05 cultura em estágios tardios da infecção.....	50
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A.....	72
ANEXO B.....	73

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença que geralmente cursa de maneira assintomática, acometendo uma ampla variedade de hospedeiros com alta prevalência na população humana (LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2011). A população de *T. gondii* apresenta estrutura complexa com cepas típicas ou clonais e atípicas ou exóticas (AJZENBERG et al., 2004).

Três linhagens clonais de *T. gondii* podem ser identificadas: tipo I, representada por parasitos que causam infecções letais em camundongos; tipo II, com virulência intermediária; e tipo III, que apresenta baixa virulência (STUTZ et al., 2012). A virulência de *T. gondii* é de difícil compreensão pelo fato de este parasito ser capaz de infectar uma considerável diversidade de hospedeiros (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Sendo assim, a susceptibilidade à infecção é variável, enquanto camundongos podem morrer em poucos dias de infecção, ratos podem nem desenvolver a doença, demonstrando que não somente fatores relacionados ao parasito podem estar envolvidos, mas fatores ligados ao hospedeiro podem influenciar a virulência de *T. gondii* (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Para a definição da virulência parâmetros como a capacidade de multiplicação do parasito, o estímulo à resposta imune, a cepa de *T. gondii* e o hospedeiro são observados (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012).

Na África e no Brasil existe alta frequência de tipos clonais mistos de *T. gondii* (LINDSTRÖM et al., 2008, DUBEY et al., 2012b). A caracterização genotípica de cepas atípicas ou exóticas revela que existe uma combinação incomum dos tipos clonais I, II e III, além de alelos não encontrados nas cepas tradicionais (BOUGHATTAS et al., 2011), sugerindo que a grande diversidade genética encontrada em cepas atípicas é o resultado de frequente recombinação gênica (SU et al. 2010; KHAN et al. 2011).

Existem dois grupos de risco potencial para esta parasitose: indivíduos imunodeprimidos e gestantes primo infectadas, sendo que estas apresentam potencialidade de transmitir verticalmente a toxoplasmose (SILVA; LANGONI, 2009). A taxa de infecção fetal é crescente durante a gestação, embora o grau de gravidade da doença para o feto seja menor nos estágios finais da gestação (GARCIA-MÉRIC et al., 2010; BOUGHATTAS et al., 2011). A primo infecção materna não é mandatória para a infecção fetal; entretanto, caso ocorra a transmissão vertical, existe possibilidade da ocorrência de graves defeitos fetais e mesmo o abortamento (BOUGHATTAS et al., 2011). Levando-se em conta que a infecção por *T. gondii* é potencialmente grave para o feto e que a diversidade genética das cepas relaciona-se com diferentes graus de patogenia de *T. gondii*, faz necessário o estudo das cepas atípicas em células trofoblásticas humanas no sentido de adicionarmos dados para melhor compreensão da

complexa interação que se estabelece no microambiente placentário quando da infecção por *T. gondii* com cepas atípicas, pois as cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05 (SALOMÃO et al., 2007) são únicas e podem apresentar comportamentos também únicos quando em contato com a mãe e o feto durante a gestação. Assim, pretende-se compreender o controle exercido pelas cepas de *T. gondii* da cidade de Uberlândia (Udi1CH-05 e Udi2CH-05) nos eventos de modulação da apoptose e secreção de citocinas em comparação a estudos já realizados pelo nosso grupo com cepas clonais, como RH e ME-49 (ANGELONI et al., 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Toxoplasma gondii* e interação parasito-hospedeiro

Toxoplasma gondii foi encontrado inicialmente em tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi*, frequentemente utilizado como modelo experimental para estudos sobre a leishmaniose no Instituto Pasteur, na Tunísia. Primeiramente, o parasito foi identificado como uma espécie do gênero *Leishmania*, mas estudos posteriores revelaram tratar-se de uma espécie nova de protozoário, e então foi denominado *T. gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). No Brasil, Splendore (1908) encontrou a mesma espécie do parasito em coelhos e, em seus primeiros estudos também classificou o parasito no gênero *Leishmania*, erro que foi logo corrigido.

Toxoplasma gondii é um membro do filo Apicomplexa, no qual são classificados diversos patógenos protozoários de importância humana e veterinária, como *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. (SULLIVAN; JEFFERS, 2012). *T. gondii* é parasito intracelular obrigatório com notável capacidade de infecção, podendo infectar diferentes espécies de mamíferos e aves em todo o mundo (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

O parasito possui forma de meia lua, com extremidade anterior pontiaguda e posterior arredondada (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). É envolto por membrana complexa, denominada película, associada com elementos do citoesqueleto garantindo a integridade estrutural e a motilidade do parasito, além de organelas típicas de células eucarióticas, como núcleo, mitocôndria, complexo de Golgi, ribossomos e retículo endoplasmático, além de uma organela crucial para o parasito denominada apicoplasto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). O apicoplasto contém um genoma circular que deve ser replicado e expresso e, alterações nesta organela resultam na morte de *T. gondii*, sendo, portanto um alvo para medicamentos contra esse parasito (McFADDEN, 2011). Além disso, o apicoplasto está envolvido na síntese de ácido lipóico, um nutriente essencial e cofator para o complexo piruvato desidrogenase durante o ciclo de Krebs (LALIBERTÈ; CARRUTHERS, 2008; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

As estruturas secretoras, micronemas, roptrias, grânulos densos juntamente com o conóide formam o complexo apical, envolvido no processo de invasão celular e localizado na região anterior (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A invasão celular por *T. gondii* consiste em um evento complexo e depende de múltiplos fatores de regulação (BLADER; SAEIJ, 2009), tais como a motilidade e reconhecimento do parasito mediante interações com a membrana da célula hospedeira, seguido da formação do vacúolo parasitóforo (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011). A adesão do parasito à célula hospedeira para a consequente invasão requer a atuação de proteínas de micronemas, como MIC2, na secreção

de adesinas dependente de cálcio, que reconhecem receptores da célula hospedeira permitindo a orientação do parasito e fixação (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Inicialmente os parasitos se aproximam da célula hospedeira e apresentam uma moderada afinidade de proteínas tais como SAGs (antígenos de superfície) e SUSAs (antígenos de superfície não relacionados à SAG) com a célula hospedeira (BOOTHROYD et al., 1998; POLLARD et al., 2008). Após a adesão do parasito à membrana da célula hospedeira ocorre uma elevação nos níveis de cálcio intracelular, promovendo mudanças nas micronemas do parasito e consequente exocitose de seu conteúdo (BLADER; SAEIJ, 2009). Adicionalmente à exocitose por constituintes do complexo apical, ocorre movimento do tipo “glinding” do parasito permitindo seu deslocamento em direção à célula hospedeira (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012).

Novos sinais são ativados e promovendo a exocitose de proteínas constituintes das roptrias (BLADER; SAEIJ, 2009) denominadas RON2, RON4, RON5 e RON8, que irão se ligar a uma proteína de micronema denominada AMA1 (ALEXANDER et al., 2005; STRAUB et al., 2009), uma proteína distribuída por toda a superfície do parasito e crucial para a invasão (ALEXANDER et al., 2005; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012) e para a proliferação do taquizoíta no interior da célula hospedeira (SANTOS et al., 2011a). Juntas, essas proteínas promovem significativamente a locomoção do parasito em direção ao interior da célula hospedeira (BLADER; SAEIJ, 2009). A invasão é um processo rápido (15 a 30 segundos) no qual a adesão da extremidade apical do parasito à membrana da célula hospedeira forma uma estrutura denominada junção em movimento, que irá se mover a partir da extremidade apical em direção à região posterior do parasito, promovendo a internalização do parasito para um vacúolo parasitóforo (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

No interior da célula hospedeira o parasito se encontra protegido pelo vacúolo parasitóforo que, após modificações bioquímicas, a fusão com lisossomos ou vesículas citoplasmáticas é bloqueada (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Com a secreção de proteínas dos grânulos densos (GRA), o parasito modula o intercâmbio de nutrientes necessários para a sua sobrevivência no interior do vacúolo parasitóforo, além de manipular o metabolismo da célula hospedeira (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Estudos demonstraram que a proteína de micronema MIC8 de *T. gondii* é essencial para o processo de invasão celular e que, na ausência desta proteína, o parasito se torna incapaz de aderir à célula hospedeira (MEISSNER et al., 2002; KESSLER et al. 2008). A secreção de proteínas por *T. gondii* para o interior da célula hospedeira, a partir de micronemas, roptrias e grânulos densos, resulta no acúmulo das mesmas na membrana de vacúolos parasitóforos

(LECORDIER et al., 1999; HAKANSSON; CHARRON; SIBLEY, 2001; ROSOWSKI et al., 2011), que são compartimentos ligados à membrana plasmática formados no momento da invasão (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Verificou-se que a proteína quinase de roptria, denominada ROP18 da cepa tipo I de *T. gondii* é capaz de fosforilar o sítio de ligação do nucleotídeo de determinadas IRGs (GTPases – enzimas que promovem a hidrólise de GTP - relacionadas com a imunidade), prevenindo a oligomerização e a hidrólise de GTP, o que inibe o acúmulo de proteínas na membrana de vacúolos parasitóforos promovendo a proteção do parasito contra destruição pela célula hospedeira (FENTRESS et al., 2010; STEINFELDT et al., 2010).

2.2. O ciclo de vida

O parasito possui diferentes estágios de infecção: taquizoíta, no qual o parasito se multiplica rapidamente; bradizoíta, quando o parasito prolifera de forma mais lenta; e esporozoíta, forma encontrada, no interior de oocistos os quais são liberados para o meio ambiente por meio das fezes dos hospedeiros definitivos (CENCI-GOGA et al., 2011). A forma taquizoíta é encontrada principalmente na fase aguda da infecção e demonstra alta capacidade de multiplicação, principalmente em tecidos musculares, oculares, placenta (MONTOYA; LIESENFELD, 2004), células nucleadas do sangue e neurônios (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012).

Os vacúolos parasitóforos formados durante a invasão da célula hospedeira abrigam os taquizoítas que se replicam rapidamente até que a célula se rompa, promovendo a liberação desses parasitos que irão invadir novas células (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; BLADER; SAEIJ, 2009). De acordo com Di Cristina e colaboradores (2008), a conversão da forma taquizoíta para a forma bradizoíta ocorre em resposta à pressão imune do organismo hospedeiro.

A forma bradizoíta permanece em estado latente no interior de cistos teciduais com paredes finas e rígidas para que continuem viáveis na célula hospedeira sem promover uma resposta imune vigorosa no hospedeiro (SULLIVAN Jr.; SMITH; JOYCE, 2009; HUNTER; SIBLEY, 2012). Morfologicamente, bradizoítas são semelhantes aos taquizoítas, porém mais finos, com núcleo deslocado do centro para a região posterior, roptrias mais eletron densas, poucos grânulos densos, maior quantidade de micronemas, acúmulo de grânulos de amilopectina e com redução dramática de divisões celulares (SULLIVAN Jr.; SMITH; JOYCE, 2009). Após a ingestão de carne mal passada contendo cistos ou água contaminada

com oocistos, a parede dos cistos ou oocistos é degradada por enzimas presentes no estômago do hospedeiro, promovendo a liberação dos bradizoítas (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Felinos são os hospedeiros definitivos para *T. gondii*. Após a ingestão de cistos teciduais pelos felinos, ocorrerá no epitélio intestinal destes animais a fase sexuada da reprodução do parasito com a formação de macro e microgametas (gameta masculino e feminino) por processo denominado merogonia, que irão se fundir e então formar o zigoto que será eliminado nas fezes como oocisto que se tronará infectante (HUNTER; SIBLEY, 2012; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). A fusão dos gametas origina oocistos diplóides que, sendo eliminados nas fezes do hospedeiro, se dividem por meiose gerando oocistos maduros, contendo oito esporozoítos haplóides (HUNTER; SIBLEY, 2012) (Figura 1).

Os oocistos maduros são altamente infecciosos, podendo infectar diferentes hospedeiros pela cadeia alimentar ou pela água (SULLIVAN; JEFFERS, 2012). A ingestão de oocistos é a principal rota de transmissão de *T. gondii* em seres humanos e em outros animais (BOYER et al., 2011; HILL et al., 2011). Após a ingestão, oocistos liberam os esporozoítos que irão invadir o epitélio intestinal e se transformar em taquizoítas, que se multiplicam rapidamente por reprodução assexuada, colonizando diferentes tecidos do hospedeiro, estimulando uma resposta imune intensa (PAN et al., 2012) (Figura 1). Estima-se que uma a cada três pessoas esteja infectada pelo parasito (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

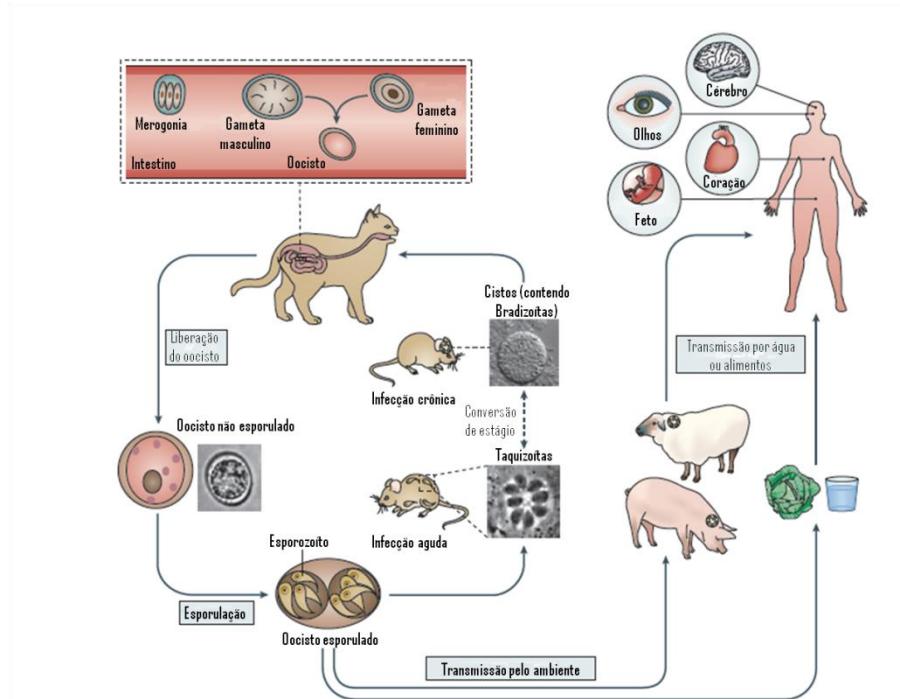


Figura 1: Representação do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Felinos são os hospedeiros definitivos para o parasito, e no trato intestinal ocorre a fase sexuada do ciclo promovendo a formação dos gametas masculino e feminino por merogonia no interior de enterócitos. A fusão dos gametas forma oocistos não esporulados e que serão eliminados para o ambiente juntamente com as fezes. Após a liberação, os oocistos passam por esporulação, formando oocistos diploides, contendo quatro esporozoítos no interior de cada um, totalizando oito esporozoítos em cada oocisto. A replicação de forma assexuada ocorre em hospedeiros intermediários. A infecção aguda se verifica pela disseminação de taquizoítas em praticamente todos os tecidos do hospedeiro. A diferenciação de taquizoítas para bradizoítas, que permanecem abrigados em cistos teciduais, impede a eliminação do parasito pelo sistema imune do hospedeiro, caracterizando a fase crônica da infecção. A ingestão dos cistos teciduais devido à cocção incorreta de carne contaminada promove a transmissão do parasito para hospedeiros intermediários ou definitivos, quando neste ultimo caso, o ciclo reinicia. A ingestão de oocistos devido à contaminação de água e alimentos ingeridos crus. A toxoplasmose acomete diversos tecidos sendo mais severa em tecidos imunoprivilegiados como a placenta (HUNTER; SIBLEY, 2012 – adaptado).

2.3. A toxoplasmose

A toxoplasmose tem forte impacto econômico por infectar animais como ovelhas, bovinos e cabras, interferindo na qualidade da carne e afetando a reprodução dos animais (SILVA; LANGONI, 2009). O parasito também pode ser encontrado em ratos, cães e gatos domésticos (BOJAR; SZYMÁNSKA, 2010).

A toxoplasmose representa alto impacto também na saúde humana, principalmente pela possibilidade de transmissão do parasito via placenta (SILVA; LANGONI, 2009). Em humanos, fatores como as condições sanitárias e do ambiente, além de hábitos alimentares, influenciam na frequência de infecção por *T. gondii* (BOJAR; SZYMÁNSKA, 2010). A

infecção ocular por *T. gondii* é a maior causa de retinocoroidite tanto em indivíduos imunossuprimidos quanto em imunocompetentes (WALLACE; STANFORD, 2008; DUBEY et al., 2012a). A transmissão vertical do parasito tem resultados devastadores sobre o feto infectado, causando retardamento mental, alterações visuais e auditivas, e abortamento (WEISS; DUBEY, 2009).

A expressão “transmissão vertical” inclui rotas de transmissão do parasito da mãe infectada para o feto antes, durante e após o parto, enquanto que a transmissão congênita se refere à transmissão de *T. gondii* de uma mulher que adquiriu a infecção durante a gestação (CARLIER et al., 2012). A transmissão materno-fetal de *T. gondii* ocorre, sobretudo via transplacentária devido à invasão do trofoblasto pelo parasito e a sua resistência pelo hospedeiro (CARLIER et al., 2012). Entretanto, a infecção aguda materna não resulta necessariamente na infecção do feto (CARLIER et al., 2012).

Estimativas da infecção pelo parasito de acordo com a idade gestacional sugerem que: 6% das mães podem transmitir o parasito para o conceito quando infectadas no primeiro trimestre de gestação, 22-40% no segundo trimestre e 58-72% infectadas no último semestre de gestação (MONTOYA; REMINGTON, 2008; RABILLOUD; WALLON; PEYRON, 2010). De acordo com Dubey e colaboradores (2012b), no Brasil altas taxas de soroprevalência (36-92%) foram encontradas em gestantes. Esses dados indicam que a soroprevalência de *T. gondii* em grávidas no país é uma das maiores em todo o mundo (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; DUBEY, 2012b). A prevalência de recém-nascidos infectados é de 5 em 1000 bebês em Uberlândia, Minas Gerais (SEGUNDO et al., 2004).

A maioria das crianças infectadas de forma congênita é assintomática ao nascer e algumas manifestarão sintomatologia durante a infância ou ainda na vida adulta (MCLEOD et al., 2009; DELAIR et al., 2011). Os casos sintomáticos são caracterizados principalmente pela doença ocular, podendo o paciente apresentar retinocoroidite, catarata, estrabismo ou nistagmo e até mesmo cegueira total (DUBEY et al., 2012b).

Raramente a transmissão congênita é documentada a partir de mães infectadas alguns meses antes da gravidez e a transmissão de *T. gondii* em mulheres imunocompetentes ocorre quando a mãe adquire a infecção durante a gestação (DUBEY et al., 2012b). Estudos recentes confirmam que bebês infectados via transplacentária apresentam taquizoítas viáveis no sangue circulante até três meses após o nascimento (CARNEIRO et al., 2013). A infecção pelo parasito no início da gestação pode levar a graves danos ao feto e as manifestações clínicas que dependem do momento em que houve a infecção (BOUGHATTAS et al., 2011). No

último trimestre de gestação a possibilidade de infecção é maior, mas com menores danos para o feto (GARCIA-MÉRIC et al., 2010).

A toxoplasmose congênita pode provocar o aborto ou caso o feto sobreviva, graves danos neurológicos e oftalmológicos (BOUGHATTAS et al., 2011). O genótipo do parasito influencia na severidade da doença (BOUGHATTAS et al., 2011) e, segundo Delhaes e colaboradores (2010), a toxoplasmose congênita causada por cepas atípicas é mais grave em comparação à infecção por cepas típicas pois gestantes infectadas com uma cepa atípica de *T. gondii* demonstrou que em seis, em um total de oito casos identificados, resultaram em toxoplasmose congênita mais grave levando à interrupção médica da gestação ou morte do bebê poucos dias após o nascimento (DELHAES et al. 2010). Além disso, em três dos oito casos, a infecção foi adquirida durante o terceiro trimestre de gestação (DELHAES et al. 2010). Acredita-se que ao contrário do comumente observado em infecções por cepas típicas, infecções durante o terceiro trimestre por cepas atípicas do parasito causem graves danos ao feto (GILBERT et al., 2008).

2.4. A resposta imune a *Toxoplasma gondii*

A partir do momento em que cistos teciduais são ingeridos, a parede que os envolve é dissolvida por enzimas presentes no trato gastrointestinal do hospedeiro tornando os parasitos livres para invadir células epiteliais ou enterócitos no intestino delgado e, posteriormente, disseminam para demais tecidos (BUZONI-GATEL et al., 2006).

Quando enterócitos são infectados por *T. gondii*, podem atuar como células apresentadoras de抗ígenos (APCs) e ainda secretar moléculas citotóxicas como óxido nítrico, quimiocinas, citocinas como IFN- γ (interferon gama), interleucinas (IL) 1 e 6, e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (MENNECHET et al., 2002; BUZONI-GATEL et al., 2006). Quimiocinas e citocinas atraem células do sistema imune inato e estimulam a produção de IL-12 (SHIN et al., 2011). IL-12, por sua vez, estimula células T e NK (*natural killer*) a secretarem IFN- γ , que, em resposta ativa células do sistema imune inato para destruição do parasito, danificando a integridade do trato intestinal (SHIN et al., 2011). Assim, IFN- γ é uma peça chave na resposta imune a *T. gondii*, pois tem a propriedade de limitar a replicação do parasito na célula hospedeira (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Os linfócitos T CD4+ presentes na lâmina própria do intestino delgado produzem níveis elevados de IFN- γ e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) auxiliando a resposta imune (MENNECHET et al., 2002; BUZONI-GATEL et al., 2006). As citocinas IL-12 e IFN- γ

atuam de forma conjunta para impedir a proliferação de *T. gondii*, prevenindo a morte do hospedeiro e consequentemente do parasito (NGUYEN et al., 2003). A ativação de macrófagos por IFN- γ e TNF- α consiste em um importante mecanismo de defesa do cérebro contra *T. gondii* (SILVA; LANGONI, 2009).

Estudos realizados por Shin e colaboradores (2011) demonstraram que o inóculo intraduodenal de *T. gondii* em camundongos promoveu a disseminação lenta do parasito e inibiu uma resposta imune no hospedeiro. Apesar de não haver aumento de IFN- γ , foi detectada linfopenia, que pode ter permitido a proliferação de taquizoítas e induzido a morte dos hospedeiros (SHIN et al., 2011).

GTPases relacionadas com a imunidade, denominadas IRGs, p47 ou somente GTPases, são as maiores contribuintes para a resistência de células hospedeiras contra patógenos intracelulares como *T. gondii* (MARTENS; HOWARD, 2006; TAYLOR, 2007; HUNN et al., 2011). Vários membros da família das proteínas IRG são expressos em diferentes tipos celulares por indução de IFN- γ , sendo que alguns desses membros como Irga6 (IIGP1) e Irgb6 (TGTP), na presença de uma cepa virulenta de *T. gondii*, se deslocam de compartimentos citoplasmáticos especificamente para a membrana do vacúolo parasitóforo (MARTENS et al., 2005; MARTENS; HOWARD, 2006; KHAMINETS et al., 2010). Esse deslocamento promove a formação de vesículas e posteriormente a ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo levando à morte do parasito (MARTENS et al., 2005; LING et al., 2006; ZHAO et al., 2009). A atividade enzimática necessária para a ação antimicrobiana se deve a Irga6 ativada em complexos oligoméricos, sendo fator essencial o acúmulo de Irga6 na membrana do vacúolo parasitóforo para ação contra patógenos (PAWLOWSKI et al., 2011). Portanto, o mecanismo de atuação de proteínas IRGs representa uma via de defesa do hospedeiro contra *T. gondii* (PAWLOWSKI et al., 2011).

A resposta imune típica ao parasito é mediada por células e predominantemente proinflamatória, denominada do tipo Th1(T helper 1). Durante o período gestacional a resposta é predominantemente caracterizada por um perfil anti-inflamatório conhecido como Th2 (T helper 2), com produção de citocinas anti-inflamatórias por células NK uterinas, linfócitos e macrófagos maternos, as quais são também sintetizadas por células de origem fetal como o trofoblasto (CHALLIS et al., 2009).

Interleucina 10 é capaz de controlar a síntese de IFN- γ a partir de linfócitos e células NK, contribuindo para o sucesso gestacional e, ao mesmo tempo, prevenindo uma forte resposta imune à presença *T. gondii* (SILVA; LANGONI, 2009). Um perfil de resposta Th1 de modo acentuado na gravidez pode resultar na rejeição do feto, gerando abortos recorrentes (SILVA;

LANGONI, 2009). A ausência de mecanismos regulatórios na produção de citocinas conduzem a casos de aborto espontâneo, pré-eclampsia e problemas intrauterinos potencialmente incompatíveis com a continuidade da gestação (ORSI; TRIBE, 2008).

De acordo com Barbosa e colaboradores (2008), *T. gondii* tem extrema habilidade para invadir e replicar em células trofoblásticas da linhagem BeWo quando estimuladas com as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-β1 (Fator de crescimento transformante 1) ou quando tratadas com a citocina proinflamatória IFN-γ.

A imunidade materna pode ser um fator limitante para a transmissão e desenvolvimento de infecções no feto ou recém nascido (CARLIER et al., 2012). Portanto, é necessário que haja um equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 para permitir o sucesso da gestação (CARRUTHERS; SUZUKI, 2007; MAUBON et al. 2008; CHALLIS et al., 2009).

Estudos anteriores revelam que recém-nascidos e crianças são capazes de desenvolver respostas específicas do tipo Th1 de forma semelhante a adultos (FATOOHI et al., 2003; GUGLIETTA et al., 2007; CIARDELLI et al., 2008; CHAPEY et al., 2010). De acordo com Carlier e colaboradores (2012), recém-nascidos infectados de forma congênita por *Trypanosoma cruzi* são capazes de superar a imaturidade do sistema imunológico, pois células T e dendríticas apresentam defeitos quantitativos e qualitativos durante o período neonatal, limitando o desenvolvimento de resposta contra o parasito, além de haver uma polarização do perfil de resposta para o tipo Th2, essencial para a sobrevivência do feto.

No curso de infecções transplacentárias, a expressão de TLR (receptores do tipo Toll) é reforçada em células trofoblásticas (HARTGERS et al., 2008). Os receptores TLR-2 e TLR-4 são capazes de reconhecer padrões de patógenos associados à membrana de *T. gondii*, *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum* (McCALL et al., 2007; TARLETON, 2007; EGAN et al., 2009).

A resposta imune humoral tem o potencial de auxiliar no combate à infecção, uma vez que anticorpos do tipo IgG maternos contribuem para a redução da parasitemia na placenta pelo aumento da captação de parasitos opsonizados, além da transferência desses anticorpos para o feto (REDLINE, 2006) em resposta a infecção por patógenos como *T. gondii*, *T. cruzi* e *Plasmodium* sp. (CORREA et al., 2007; HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011).

2.5. Cepas de *Toxoplasma gondii*

Existem três linhagens clonais principais de *T. gondii*: tipo I, II e III. A patogenia destas cepas foi definida em camundongos sendo que a cepa tipo I causa infecções letais, tipo II, possui virulência moderada e tipo III é de baixa virulência (STUTZ et al., 2012). A estrutura clonal de *T. gondii* é composta por um baixo nível de divergências genéticas, sendo de 1 a 2%

de diferenças na sequência do DNA das três linhagens (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A maioria das cepas encontradas na América do Sul, África, ou Ásia não se classifica entre as linhagens clonais, exceto a linhagem clonal tipo III que é considerada cosmopolita (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Como exemplos de cepas clonais tipo I, verifica-se PIL, BK e ATIH; tipo II, ME49, BEV e BOU; e do tipo III, NED, CEP e LGE97-3 (AJZENBERG et al., 2004). A tentativa de agrupar as diferentes cepas de acordo com as características gênicas é dificultada devido a polimorfismos únicos que não permitem a classificação em um grupo específico, pois cepas atípicas podem apresentar combinações gênicas que conferem fenótipo virulento, de moderada ou baixa virulência (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Robert-Gangneux e Dardé (2012) afirmam que na Europa cepas do tipo II são predominantes, as do tipo III são encontradas apenas em determinadas regiões, enquanto demais genótipos são pouco comuns, e, na América do Norte, bem como na Europa, encontram-se cepas dos tipos II e III, embora se verifique demais genótipos. Na América Central e do Sul encontra-se alta diversidade genética, caracterizada por cepas atípicas, enquanto cepas tipo I e II são pouco comuns, enquanto na Ásia, há baixa diversidade genética em relação à América do Sul, embora cepas do tipo III sejam encontradas (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No continente africano, cepas atípicas são normalmente encontradas, assim como cepas clonais tipo II e tipo III (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A expansão geográfica de genótipos idênticos entre os continentes pode ter sido facilitada por atividades humanas promovendo a antropização de áreas até então consideradas selvagens, mas também a migração de aves, além de roedores e felinos, sendo esses últimos nos navios negreiros, durante o período de escravidão (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A existência de cepas atípicas relaciona-se a ciclos regulares de reprodução sexuada e cruzamento em áreas onde animais selvagens desempenham papel mais significativo na transmissão do parasito (AJZENBERG et al., 2004; KHAN et al., 2007; GRIGG; SUNDAR, 2009). Evidências indicam que a autofertilização é uma importante etapa que conduz à expansão e transmissão de parasitos com variação genética (WENDTE et al., 2010). As taxas relativas de cruzamento e autofecundação de *T. gondii* são determinadas pela frequência de infecções por mais de uma cepa do parasito em hospedeiros intermediários que mais tarde são predados por felinos (PAN et al., 2012). Entretanto, infecções múltiplas são raras devido à

resposta imune gerada pelo hospedeiro durante o primeiro contato com o parasito, que tenta impedir uma reinfecção (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

No Brasil, a toxoplasmose ocular em crianças infectadas congenitamente está associada a genótipos atípicos de *T. gondii* (GILBERT et al., 2008). Do mesmo modo, casos graves de toxoplasmose foram relatados em pacientes imunocompetentes relacionados à infecção por cepas exóticas do parasito (AJZENBERG et al. 2004; DEMAR et al. 2007; ELBEZ-RUBINSTEIN et al. 2009; GRIGG; SUNDAR, 2009; DELHAES et al. 2010; POMARES et al. 2011).

Dubey e colaboradores (2012a) demonstraram que, pelo menos em camundongos, a infecção por *T. gondii* pode causar enterite severa ou até mesmo ser letal independentemente de diferenças genéticas entre cepas. Entretanto, o mesmo grupo também verificou que oocistos de determinadas cepas podem ser mais ou menos patogênicas, destacando as diferenças na constituição protéica de acordo com a diversidade genética. Sendo assim, o mapeamento genético é de fundamental importância na identificação de genes responsáveis pela diferença natural de virulência de *T. gondii* (SIBLEY, 2009).

No estado de Minas Gerais existe uma ampla diversidade genética em cepas de *T. gondii* (CARNEIRO et al., 2013). Estudo realizado com galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii* em áreas urbanas e suburbanas da cidade de Uberlândia (MG) revelaram a presença de duas cepas de *T. gondii* as quais foram denominadas de Udi1CH-05 e Udi2CH-05 (SALOMÃO et al., 2007).

Para a genotipagem dos isolados, foram utilizados doze primers diferentes, verificando-se que as cepas Udi1-CH05 e Udi2-CH05 são o resultado de recombinações genéticas das três linhagens clonais *T. gondii*, além de alelos não comuns à cepas tradicionais do parasito. Enquanto Udi1-CH05 possui cinco marcadores genéticos da cepa tipo I, dois para tipo II e cinco para tipo III, Udi2-CH05 apresenta nove marcadores para o tipo I, um para tipo II e um para tipo III, além de um alelo atípico daqueles encontrados nos tipos I, II e III do parasito, denominado c22-8 (SALOMÃO et al., 2007).

As duas cepas diferem em relação ao tempo necessário para romper a célula hospedeira e a formação de cistos teciduais, indicando diferença de virulência entre as mesmas (SALOMÃO et al., 2007). Células fibroblásticas da linhagem HFF quando infectadas por essas cepas atípicas demonstram comportamentos diferenciados: enquanto Udi1CH-05 replica mais lentamente no interior da célula hospedeira, a cepa Udi2CH-05 é capaz de replicar e romper as células hospedeiras em menor intervalo de tempo (SALOMÃO et al., 2007). Conforme Salomão e colaboradores (2007), a infecção por Udi1CH-05 ou Udi2CH-05 *in vivo* resulta em

baixa taxa de sobrevivência dos modelos experimentais roedores *Calomys callosus* e *Meriones unguiculatus* (gerbil) e os camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6, o que demonstra semelhanças de ambas as cepas atípicas com cepas virulentas de *T. gondii*.

2.6. Apoptose

A morte celular programada é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas das células e tem papel preponderante tanto no desenvolvimento embrionário quanto na vida adulta de animais através da eliminação de células desnecessárias, células anormais ou não funcionais, como linfócitos T e B que não produzem antígeno-específicos, controle da proliferação celular, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (ALBERTS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2012).

A apoptose é um tipo de morte celular induzida por um programa de suicídio estritamente regulado e dependente da ação de caspases (PARK, 2012) em que as células destinadas a morrer ativam enzimas capazes de degradar o próprio DNA e proteínas nucleares e citoplasmáticas (ROBBINS et al., 2007). A apoptose é o mecanismo mais conhecido de morte celular e, durante esse processo, verifica-se: encolhimento e condensação do conteúdo; perda da função estrutural do citoesqueleto; desaparecimento do envelope nuclear e condensação do núcleo com posterior rompimento da cromatina; formação de estruturas semelhantes a bolhas além de alterações químicas na superfície da célula; fragmentação da célula formando os chamados corpos apoptóticos (ALBERTS et al., 2008). A membrana plasmática da célula permanece intacta, entretanto é alterada de maneira que a célula e seus fragmentos tornam-se alvos de fagócitos (ROBBINS et al., 2007). Assim, células em processo de apoptose são fagocitadas por macrófagos ou células adjacentes evitando que o conteúdo extravase, prevenindo a ocorrência de uma resposta imune (ROBBINS et al., 2007; ALBERTS et al., 2008).

As moléculas efetoras da apoptose são denominadas caspases pelo fato de serem proteases de cisteína que clivam proteínas específicas como as do citoesqueleto na região C-terminal em resíduos de aspartato (LODISH et al., 2002; ROBBINS et al., 2007). Caspases são classificadas em dois grupos com base na sequência de ativação e atuação na apoptose: caspases iniciadoras, tais como caspase-2, 8, 9 e 10, e caspases efetoras, tais como caspase-3 e 7 (PARK, 2012). As caspases 1, 4 e 5 estão envolvidas na inflamação (FUENTES-PRIOR; SALVESSEN, 2004).

As caspases são sintetizadas como moléculas de zimogênio de cadeia única e requerem um processo altamente regulado para ativação, que ocorre pela dimerização dessas moléculas

(PARK, 2012). Tanto a dimerização quanto clivagens são fundamentais para a integridade dos sítios ativos das caspases e consequentemente necessários para a ativação (RIEDL; SHI, 2004). Durante a apoptose, as caspases são ativadas para que possam clivar diferentes alvos, resultando na ativação de nucleases que degradam DNA e enzimas que destroem proteínas de citoesqueleto e nucleares (ROBBINS et al., 2007).

Os chamados domínios de morte constituem uma superfamília que compreende quatro grupos: subfamília domínio de morte (DD), subfamília de domínios efetores de morte (DED), subfamília de domínios de recrutamento de caspase (CARD), e subfamília de domínio pyrin (PYD) (REED; DOCTOR; GODZIK, 2004). As caspases iniciadoras 2 e 9 possuem domínios de morte do tipo CARD enquanto as caspases 8 e 10 possuem o tipo DED, que interagem com a região N-terminal das caspases e, esses domínios são necessários para a oligomerização de procaspases (FUENTES-PRIOR; SALVESSEN, 2004).

Três vias principais podem desencadear a apoptose: a via do receptor de morte ou extrínseca (ROBBINS et al., 2007); a via mitocondrial ou intrínseca; e a via mediada por granzima B (HIEBERT; GRANVILLE, 2012) (Figura 2). A via extrínseca é desencadeada por ligação de ligantes extracelulares específicos em receptores transmembrana, principalmente os receptores membros da família do fator de necrose tumoral (TNFR), que ativam cascatas caspase-dependentes (KAUFMANN; EARNshaw, 2000). Para remover células desnecessárias ou potencialmente perigosas, o receptores de superfície celular, pertencentes à superfamília do fator de necrose tumoral, reconhecem os ligantes de morte para desencadear o processo (PARK, 2012).

Os indutores de apoptose mais bem estudados são TNF- α , FasL (Fas ligante, também conhecido como ligante Apo-1/CD95) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF, também conhecido como Apo2L) (SPENCER; SORGER, 2011). A interação desses ligantes a trímeros de receptores específicos causam modificações conformacionais que ativam os complexos indutores de morte (DISCs) na cauda citoplasmática desses receptores (GONZALVEZ; ASHKENAZI, 2010).

Os DISCs contêm múltiplas proteínas adaptadoras que recrutam e promovem a ativação de procaspases (SPENCER; SORGER, 2011). A composição dos DISCs difere no tipo de receptor de morte e no tipo de internalização do sinal (SCHUTZE; TCHIKOV; SCHNEIDER-BRACHERT, 2008). Um aspecto marcante da família de receptores de TNF é a capacidade de ativar tanto cascatas proapoptóticas quanto de sobrevivência, além de ampliar a sinalização de morte em determinado local para permitir o equilíbrio do processo (SPENCER; SORGER, 2011).

Os sinais de morte são promovidos pela ativação das procaspases iniciadoras 8 e 10 no complexo DISC, e, este processo é modulado pela procaspase-8 inativa homóloga a proteína inibidora de FLICE (FLIP) (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004). Os sinais que promovem a sobrevivência da célula geralmente estão relacionados à ativação do fator de transcrição NF-κB, a indução da proteína quinase mitógeno-ativado (MAPK) e cascata de sinalização da proteína quinase B (Akt) (FALSCHLEHNER et al., 2007). As caspases iniciadoras recrutadas para o complexo DISC clivam procaspases efetoras 3 e 7 promovendo a ativação de proteases (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004). As caspases efetoras clivam proteínas estruturais essenciais como citoqueratinas e lamininas nucleares, além do inibidor de DNase ativada por caspase (iCAD) que libera DNase (CAD) para digestão do DNA cromossômico levando à morte celular (SPENCER; SORGER, 2011).

Na via intrínseca, a indução de morte ocorre por danos ou mau funcionamento da célula causados por estresse, luz ultravioleta ou irradiação ionizante, ativação de oncogenes ou exposição a substâncias tóxicas (KAUFMANN; EARNshaw, 2000; PARK, 2012). Além disso, essa via envolve a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, um fator necessário para a ativação de caspases efetoras (SCAFFIDI et al., 1998). A mitocôndria é a peça central da via intrínseca da apoptose e a caspase-9 é a principal iniciadora desse evento (PARK, 2012).

A formação de poros é modulada por membros da família de proteínas Bcl-2, assim denominada devido a seu isolamento em células B de linfoma, que pode ser dividida em quatro grupos principais: 1) as proteínas efetoras, Bax e Bak, que iniciam a formação dos poros na membrana externa da mitocôndria; 2) as proteínas inibidoras de Bax e Bak, que se associam a Bcl-2, Mcl1 e BclxL; 3) as proteínas ativadoras de Bax e Bak, como Bid e Bim; e 4) as proteínas sensibilizadoras, como Bad, Bik e Noxa, que antagoniza o efeito antiapoptótico de proteínas como Bcl-2 (LETAI, 2008). Durante a via extrínseca, as caspases iniciadoras são ativadas pelo complexo DISC e clivam Bid, formando tBid, que promove mudanças conformacionais nas proteínas Bax e Bak, direcionando a oligomerização (SPENCER; SORGER, 2011). Os oligômeros Bax e Bak criam poros na membrana externa da mitocôndria e favorecem a translocação citoplasmática de reguladores críticos da apoptose, como o citocromo c, encontrado no espaço intermembranas (SPENCER; SORGER, 2011).

As proteínas da família Bcl-2 são classificadas de acordo com a atividade específica com a presença de domínios homólogos de Bcl-2, chamados domínios BH (THOMADAKI; SCORILAS, 2008; BRUNELLE; LETAI, 2009). Entre os membros que atuam com fatores proapoptóticos, estão as BAX, com os domínios BH1, BH2 e BH3 (LALIER et al., 2007),

BAD e BID apresentando o domínio BH3 (MARDSEN; STRASSER, 2003). Os fatores antiapoptóticos de Bcl-2 interferem na permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias, bloqueando a apoptose (THOMADAKI; SCORILAS, 2008; BRUNELLE; LETAI, 2009).

A permeabilização da membrana externa da mitocôndria é um processo rápido e marca o início da sinalização para morte celular e, a partir deste ponto o processo não pode mais ser revertido (CHIPUK; BOUCHIER-HAYES; GREEN, 2006; TAIT et al., 2010). O papel da mitocôndria na ativação da apoptose é conhecido (PINKOSKI; WATERHOUSE; GREEN, 2006; WANG; YOULE, 2009) devido a importância da liberação de citocromo c (GOLDSTEIN et al., 2000; GOGVADZE; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2006), promovendo a formação do apoptossomo (ZOU et al., 1999). Uma vez translocado para o citosol, o citocromo c se combina com o fator 1 da protease ativadora de apoptose (Apaf-1) e com a caspase-9, formando o apoptossomo, responsável por clivar e ativar procaspases efetoras (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004).

A via de sinalização por granzima B (GrB) envolve a ação de granzima e perforina (HIEBERT; GRANVILLE, 2012). A GrB possui capacidade incomum de clivar substratos na região de resíduos de ácido aspártico sendo dependente da presença de um resíduo de arginina no sítio de ligação, ação semelhante à das caspases (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). Linfócitos citotóxicos contêm compartimentos secretórios especializados os quais possuem comunicação com as organelas munidas de proteínas com ação citolítica (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). Até o momento, cinco granzimas foram identificadas em humanos: GrA, GrB, GrH, GrK e GrM , entre as quais as mais bem estudadas são GrA e GrB (HIEBERT; GRANVILLE, 2012).

A GrB é capaz de ativar caspases *in vitro* tais como caspases 2, 3, 6, 7, 8, e 9 e *in vivo*, como as caspases 3, 7, 8 e 10 (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). A morte pode então ser desencadeada a partir da ativação de caspase 3 via GrB promovendo a morte induzida por linfócitos citotóxicos ou ainda por ativação da via intrínseca da apoptose (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). Contudo, a apoptose mediada por GrB depende da entrada dessa enzima para o citoplasma da célula alvo, um processo que requer o rompimento da membrana por ação de perforina e que ativa a via mitocondrial da apoptose (HIEBERT; GRANVILLE, 2012) mediante a clivagem de Bid que gera tBid e induz a oligomerização de membros proapoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bak (LALIER et al., 2007; EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). A oligomerização promove a liberação de citocromo c e a formação do apoptossomo e, a liberação de moléculas do espaço intermembranas tais como

SMAC/DIABLO diminuindo a inibição por XIAP e permitindo a ativação completa de caspase-3 (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). Em humanos, a apoptose mediada por GrB é dependente da ativação de caspase-3 e da permeabilização da membrana externa das mitocôndrias, pois determinados substratos de GrB são encontrados no espaço intermembranas, como ICAD/DFF45 (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012).

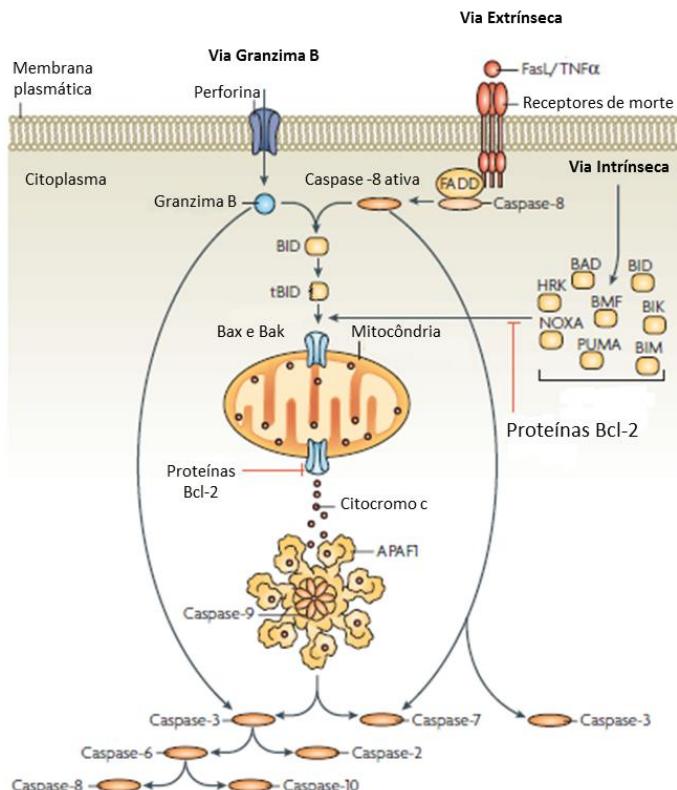


Figura 2: Esquema das principais vias de sinalização da apoptose. A via intrínseca inicia pela sensibilização de membros proapoptóticos que ativam Bax e Bak as quais formarão poros na membrana externa de mitocôndrias, permitindo a liberação de citocromo c a partir do espaço intermembranas dessas organelas. O citocromo c é essencial para a formação do apoptossomo a partir da ligação a Apaf-1, ativando a caspase-9 e consequentemente as caspases 3 e 7. A via extrínseca depende da ligação de moléculas extracelulares tais como FasL e TNF- α para ativação de cascatas de sinalização para a morte celular devido a modificações conformacionais e promovendo a formação dos complexos DISCs que por sua vez contem proteínas adaptadoras, como FADD, para recrutamento e ativação da procaspase 8 que tem ação direta na ativação das caspases efetoras 3 e 7 (em células do tipo I), ou ainda pode clivar BID em tBID, desencadeando a atividade de Bax e Bak, e parte da via intrínseca da apoptose (células tipo II). Proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 podem reverter o processo de morte somente até o momento da formação de poros na membrana externa das mitocôndrias. A morte via granzima depende da ação de perforina para que a molécula de granzima B possa ser internalizada pela célula. Essas moléculas são secretadas por linfócitos T citotóxicos e células NK. Granzima B cliva substratos bem como as caspases, podendo desencadear a morte via clivagem de BID em tBID ou ativação direta de caspase 3 (TAYLOR et al., 2008 – adaptado).

Um aspecto marcante da família de receptores de TNF é a capacidade de ativar tanto cascadas proapoptóticas quanto de sobrevivência, além de ampliar a sinalização de morte em determinado local para permitir o equilíbrio do processo (SPENCER; SORGER, 2011).

Os sinais de morte são promovidos pela ativação das procaspases iniciadoras 8 e 10 no complexo DISC, e, este processo é modulado pela procaspase-8 inativa homóloga a proteína inibidora de FLICE (FLIP) (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004). Os sinais que promovem a sobrevivência da célula geralmente estão relacionados à ativação do fator de transcrição NF-κB, a indução da proteína quinase mitógeno-ativado (MAPK) e cascata de sinalização da proteína quinase B (Akt) (FALSCHLEHNER et al., 2007). As caspases iniciadoras recrutadas para o complexo DISC clivam procaspases efetoras 3 e 7 promovendo a ativação de proteases (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004). As caspases efetoras clivam proteínas estruturais essenciais como citoqueratinas e lamininas nucleares, além do inibidor da caspase ativada DNase (iCAD) que libera DNase (CAD) para digestão do DNA cromossômico levando à morte celular (SPENCER; SORGER, 2011).

A atividade das caspases no citoplasma é regulada negativamente por ação das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), tais como XIAP (proteína inibidora da apoptose ligada ao fator X) e survivina, as quais podem ser encontradas no espaço intermembranas de mitocôndrias (LI et al., 2012) do citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto ao longo da gestação (GRUSLIN; QIU, 2001; KA; HUNT, 2003). A proteína survivina é liberada da mitocôndria durante a apoptose, resultando na inibição da ativação da caspase-9 (LI et al., 2012). A inibição por XIAP ocorre mediante associação desta proteína com o sitio catalítico de caspases efetoras 3 e 7, bloqueando a atividade protease e promovendo a degradação dependente de ubiquitina (SPENCER; SORGER, 2011). A ligação do Segundo ativador mitocondrial de caspases (Smac) a XIAP impedem essa inibição possibilitando que caspases efetoras clivem seus substratos e causem a morte celular (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004).

A capacidade de manipulação de proteínas da família Bcl-2 já foi descrita em vírus (GALLUZZI et al., 2008), bactérias (FAHERTY; MAURELLI, 2008) e protozoários (CARMEN; SINAI, 2007). Essa manipulação é capaz de promover ou inibir a apoptose resultando no sucesso do parasito em contato com hospedeiro (CARMEN; SINAI, 2011).

2.7. Apoptose, *Toxoplasma gondii* e a gestação

O processo de apoptose é extremamente importante para o desenvolvimento normal da placenta, incluindo os processos de tolerância imune materna, homeostase dos tecidos (CROCKER et al., 2003), invasão pelo trofoblasto e transformação das artérias espiraladas,

assim como a diferenciação do trofoblasto (STRASZEWSKI-CHAVEZ; ABRAHAMS; MOR, 2005). Ao iniciar o processo de apoptose, a exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática da célula funciona como um sinalizador para a fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos (FADOK et al., 1998; KOZMAR; GREENLEE-WACKER; BOHLSON, 2010).

O complexo Fas/FasL atua na principal via de regulação da apoptose e está envolvido na manutenção da característica de tecidos imunoprivilegiados, em tumores e em locais específicos como o útero durante a gestação (GULLER; LACHAPELLE, 1999; KIM et al., 2004). O complexo envolvido no processo de apoptose formado por Fas e seu ligante é expresso em linhagens de células de coriocarcinoma humano como JEG-3 e JAR (HAMMER et al., 2002), além de ser encontrado em células das linhagens BeWo e NJG (RAJASHEKHAR et al., 2003), indicando uma potencial via de regulação de resposta imune durante a gestação além de regulação do processo de apoptose nessas células (CHEN et al., 2011).

Em células trofoblásticas a apoptose ocorre naturalmente promovendo a eliminação de células sem que haja um processo de inflamação (HUPPERTZ; KADYROV; KINGDOM, 2006) sendo um evento essencial para o desenvolvimento normal da placenta (LI et al., 2012). Alterações na apoptose do trofoblasto podem causar danos ou a morte do embrião (LEVY; NELSON, 2000). Células necessitam da presença contínua de sinalizadores de sobrevivência, como fatores de crescimento e citocinas; caso contrário, um processo degenerativo conhecido como morte por negligência é induzido (RODRIGUES et al., 2012). Patógenos intracelulares utilizam desse controle do tempo de vida da célula hospedeira para sua própria sobrevivência (ANGELONI et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012).

O sucesso da infecção por *T. gondii* depende da capacidade de evasão deste parasito aos mecanismos de imunidade do hospedeiro (SANTOS et al., 2011b). Porém, a proliferação deve ser controlada para que o hospedeiro sobreviva e permita dessa forma a sobrevivência do parasito (SANTOS et al., 2011b). Por ser um patógeno intracelular obrigatório, *T. gondii* é extremamente adaptado para sobrevivência no meio intracelular (SINAI et al., 2004; BOYLE; RADKE, 2009), e pode interferir ou neutralizar o sistema imune do hospedeiro (BOOTHROYD, 2009) impedindo a apoptose da célula hospedeira (BANNAI et al., 2009).

Em condições normais, PI3-K (fosfatidil-inositol 3-quinase) / PKB (proteína-quinase B) e a via de MAPK, entre outros, podem constitutivamente promover a fosforilação de membros da família Bcl-2 como Bad, Bax, Bim, induzindo sua degradação citoplasmática e conferindo sinais de sobrevivência para a célula (RODRIGUES et al., 2012). Em diferentes modelos

experimentais, a desestabilização de lisossomos e o efluxo de catepsinas atuam como reguladores da sinalização de morte celular (GUICCIARDI; LEIST; GORES, 2004).

O parasita intervém com diferentes intensidades no processo de apoptose e no ciclo celular, de acordo com a virulência de cada cepa (RH e ME-49), o que pode ser determinante para o desenvolvimento da toxoplasmose durante a gestação (ANGELONI et al., 2009). Os eventos antiapoptóticos se devem não somente ao bloqueio da via NF κ B, mas também pela inibição da ativação de JNK (c-Jun-N-terminal quinase), como observado em células HeLa (CARMEN; SOUTHARD; SINAI, 2008). Angeloni e colaboradores (2009) verificaram que células BeWo e HeLa infectadas com a cepa ME-49 (tipo II de *T. gondii*) apresentaram maior índice de apoptose quando comparado com a infecção pela cepa RH (tipo I) e com os controles não infectados, demonstrando o comportamento diferenciado da cepa ME-49 de *T. gondii* em induzir a apoptose em células hospedeiras nos estágios iniciais da infecção.

De acordo com Lalibertè e Carruthers (2008), *T. gondii* interfere nos processos de diferenciação, proliferação celular e apoptose. Quando envolvido na apoptose, esse protozoário é capaz de promover ou inibir a morte celular (JAMES; GREEN, 2004), reprogramando processos celulares devido ao envolvimento nos complexos sistemas celulares (CARMEN; SINAI, 2011) (Figura 3). *T. gondii* é capaz de proteger células hospedeiras da apoptose desencadeada via GrB pela anulação da atividade dessa enzima em células infectadas (YAMADA et al., 2011).

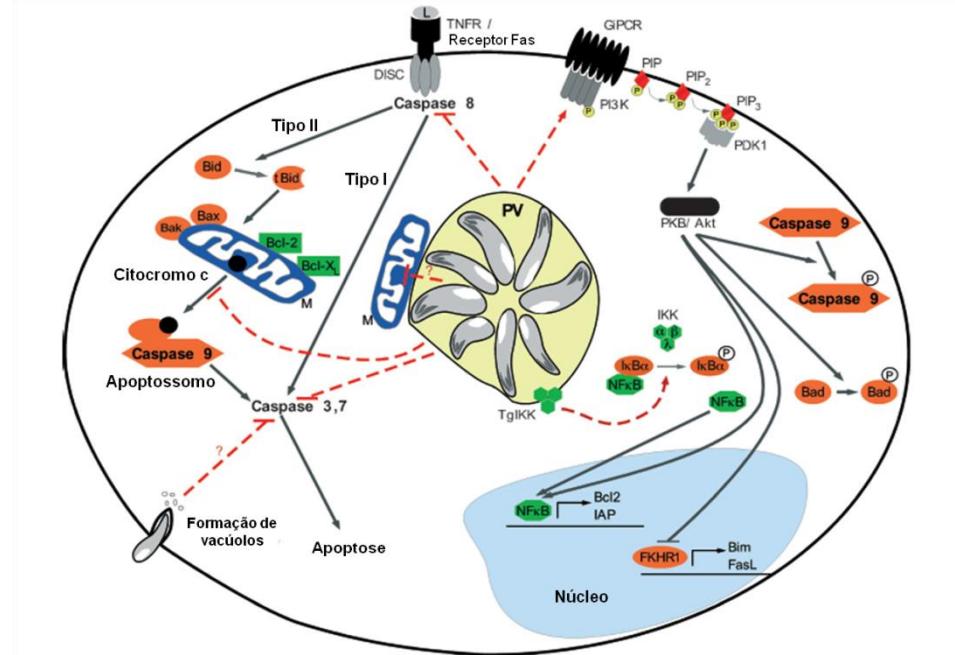


Figura 3: Esquema da interferência de *T. gondii* na apoptose de células hospedeiras. As caspases iniciadoras 8 e 9 e executoras 3 e 7 são inativadas após a invasão de *T. gondii*. A indução da apoptose em células tipo I (sem a participação de mitocôndrias no processo de morte) ou tipo II (envolve a participação de mitocôndrias) ocorre a partir do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) e receptores do tipo Fas, podendo ser inibida por *T. gondii* por meio da degradação de caspase 8. A infecção inibe a liberação de citocromo c a partir do espaço intermembranas de mitocôndrias e, proteínas secretadas a partir de organelas do parasito podem atuar na inibição das caspases 3 e 7. A translocação de NF-κB para o núcleo após a infecção promove a expressão de moléculas antiapoptóticas como as IAPs e membros da família Bcl-2. A fosforilação do inibidor κBα do hospedeiro e proteínas IKK do parasito estão envolvidas na ativação de NFκB. A fosforilação da via PI3K em células infectadas permite a inativação de Bad, inibição do fator de transcrição forkhead (FKHRI) e ativação de NFκB (RODRIGUES et al., 2012 - adaptado).

Com base na capacidade de interferência de *T. gondii* nos processos celulares como a modificação do metabolismo a seu favor e a indução ou bloqueio da apoptose de acordo com o genótipo do parasito, se faz necessário o estudo do controle da morte celular exercido por cepas atípicas em células trofoblásticas com o intuito de compreender as bases da gravidade da toxoplasmose congênita causada por cepas que não são classificadas como clonais, como Udi1CH-05 e Udi2CH-05.

2.8. OBJETIVOS

2.8.1. Objetivo geral

Investigar a modulação do processo de morte celular por apoptose bem como a secreção de citocinas anti e proinflamatórias por células trofoblásticas da linhagem BeWo infectadas por cepas atípicas (Udi1CH-05 ou Udi2CH-05) de *T. gondii*.

2.8.2. Objetivos específicos

- Determinar o índice de apoptose em células da linhagem BeWo mediante infecção ou não com as cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05, das categorias cultura ou *C. callosus*/cultura durante períodos de 2, 6 ou 12 horas;
- Verificar o índice de infecção e o número de parasitos por célula, em células BeWo foram infectadas com as cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05 de *T. gondii*, comparando-se as categorias cultura e *C. callosus*/cultura por tempos de 2, 6 ou 12 horas de infecção;
- Verificar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e proinflamatórias (IL-12 e TNF- α) por células BeWo quando infectadas por Udi1CH-05, cultura e *C. callosus*/cultura; e Udi2CH-05, cultura e *C. callosus*/cultura, por 2, 6 ou 12 horas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção de células BeWo

Foram utilizadas células trofoblásticas da linhagem BeWo adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução do Setor de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Essas células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² (SPL Life Sciences, Coreia) com meio RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil) com adição de antibiótico (100U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (meio de cultura completo) (Cultilab, Brasil), e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A cada dois dias, foi realizado o repique e, para isso, as células foram extraídas das garrafas de cultura com 600μl de solução de tripsina e EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) na estufa. Após cinco minutos, as garrafas foram retiradas da estufa e homogeneizadas com auxílio de meio de cultura a 10% de soro bovino fetal e colocadas em tubos do tipo falcon e centrifugadas a 1500rpm por cinco minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado, o “pellet” homogeneizado com meio completo e metade da solução de células foi colocada de volta na garrafa.

3.2. Manutenção das cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05

Para os experimentos, as cepas exóticas foram obtidas a partir de duas origens distintas: aquelas que foram isoladas (SALOMÃO et al., 2007) e mantidas somente em cultura, foram denominadas cultura. Entretanto, parasitos com a mesma origem foram inoculados em roedores da espécie *Calomys callosus* na tentativa de estimular fatores de virulência, e posteriormente, mantidos em cultura, foram denominados *C. callosus*/cultura.

3.2.1. Categoria cultura

As cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05 foram fornecidas pelo professor Dr. José Roberto Mineo, do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia. Essas cepas foram mantidas em garrafas de 25cm² de cultura com meio RPMI 1640 com adição de antibiótico e 2% de soro bovino fetal, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em dias alternados, o meio das garrafas com células infectadas foi trocado, centrifugado o sobrenadante por cinco minutos a 1500rpm e então o “pellet” homogeneizado foi colocado de volta na garrafa de cultura e adicionado 250μl de solução de células BeWo para permitir a sobrevivência do parasito.

3.2.2. Categoria *C. callosus*/cultura

As cepas Udi1CH-05 e Udi2CH-05 da condição cultura foram obtidas por centrifugação e 100 μ l de solução de parasitos foram inoculadas via intraperitoneal em *C. callosus*. Após aproximadamente 7 dias de infecção, os parasitos foram recuperados a partir da cavidade peritoneal desses roedores e adicionados em garrafas de cultura de 25cm², com meio RPMI 1640 com adição de antibiótico e suplementado com soro bovino fetal a 2%. O meio de cultura foi trocado em dias alternados de maneira idêntica à condição cultura. Os parasitos foram considerados aptos para realização de experimentos a partir da segunda troca de meio, desde que não fosse detectado nenhum tipo de contaminação. Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO B).

3.3. Condição experimental

Para a realização dos experimentos, células foram retiradas das garrafas de cultura com auxílio de solução de tripsina e EDTA 0,25% e então centrifugadas e homogeneizadas em 1ml de meio de cultura completo. Então, uma alíquota de 20 μ l de solução contendo as células juntamente com 20 μ l de Azul de Trypan foram analisadas e contadas na Câmara de Neubauer, descartando-se as células coradas em azul, por serem consideradas inviáveis. Então, foram utilizadas placas de 24 poços (TPP, Suíça) contendo lamínulas de 13mm de diâmetro para plaquear 5x10⁴ células por poço em 200 μ l de meio completo. A placa foi mantida em estufa até que as células ficassem confluentes (aproximadamente 24 horas).

Na sequência, as células foram infectadas com as cepas Udi1CH-05 ou Udi2CH-05 das condições cultura e *C. callosus*/cultura. Para isso, as garrafas contendo os parasitos foram lavadas separadamente para retirar os parasitos eventualmente aderidos e o sobrenadante foi centrifugado por cinco minutos a 1500rpm e o “pellet” homogeneizado em 1ml de meio de cultura completo, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer excluindo as células inviáveis da contagem com auxílio do corante Azul de Trypan. Após a adequação da contagem de cada cepa e em cada condição, as células foram infectadas com 1,5x10⁵ parasitos por poço, obedecendo a uma proporção de 3 parasitos por célula. Como controle, células BeWo receberam apenas meio de cultura.

Após períodos de 2, 6 ou 12 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C, para posterior dosagem de citocinas, e as células foram fixadas com formol a 10% em TBS por 24 horas. Então, as células infectadas ou não foram mantidas em TBS até a realização da reação de imunohistoquímica para detecção de células em processo de morte

celular por apoptose. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata mediante aceite do Comitê de Ética (ANEXO A).

3.3.1. Determinação do índice de apoptose

Para verificação da apoptose por reação de imunohistoquímica, inicialmente foi realizado o bloqueio da fosfatase endógena com solução de ácido acético a 5% por 5 minutos nas lamínulas previamente fixadas com formol, e após lavagens com TBS, o bloqueio de sítios inespecíficos com soro normal de cabra a 2,5% a 37°C. Passados 45 minutos, as células foram incubadas com anticorpo primário monoclonal M30 (M30 Cytodeath – Roche, Alemanha), um marcador de citoqueratina 18, produzido em camundongo, na diluição de 1:250, a 4°C “overnight”. No dia seguinte, após lavagem com TBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti camundongo biotinilado produzido em cabra, na proporção de 1:600, por 1 hora a 37°C. As células foram novamente lavadas e incubadas com complexo ABC (Complexo Avidina-Biotina) (ABC kit Vectastain – Vector Laboratories, Estados Unidos) conjugado com fosfatase alcalina, na diluição de 1:100, durante 30 minutos a 37°C. Então, a reação foi revelada com Fast Red Naphthol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) por 8 minutos. As lamínulas com as células aderidas foram lavadas com TBS novamente e contracoradas com hematoxilina de Harris. Foi realizada a diferenciação da coloração com água amoniacal na proporção de 1:100 e posteriormente a montagem das lâminas com glicerina e esmalte.

Para determinação do índice de apoptose, foram contadas 100 células aleatórias por lamínula e destas, quantas estavam marcadas, de acordo com Angeloni e colaboradores (2009).

3.3.2. Determinação do índice de infecção e do número de parasitos por célula

O índice de infecção e o número de parasitos por célula foram determinados a partir da análise das mesmas lâminas obtidas pela reação de imunohistoquímica para determinação do índice de apoptose, sendo que o índice de infecção foi obtido pela contagem de 100 células aleatórias por lamínula, e dentre essas, quantas estavam infectadas. O número de parasitos intracelulares foi obtido pela contagem de 100 células infectadas e, dentro de cada célula infectada, quantos parasitos intracelulares, caracterizando o parasitismo total. Finalmente, o número total de parasitos foi dividido por 100 para encontrar a média de parasitos por célula (BARBOSA et al., 2008).

3.4. Detecção da produção de citocinas

As citocinas proinflamatórias, IL-12 e TNF- α , e anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- β , foram detectadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA, a partir do sobrenadante coletado após cada período de infecção (2, 6 ou 12 horas) com as cepas Udi1CH-05 ou Udi2CH-05, das categorias cultura ou *C. callosus*/cultura, de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das placas foi realizada a 450nm e os dados de densidade óptica (DO) foram convertidos em pg/ml com auxílio do *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). Os limites de detecção verificados para cada citocina foram: 4pg/ml (IL-12); 2pg/ml (TNF- α); 3,9pg/ml (IL-10); e 4,61pg/ml (TGF- β).

3.4.1. Interleucina 12 (IL-12)

Para a detecção de IL-12 (p70) (BD optEIA, Estados Unidos), uma placa de 96 poços (Costar – Corning 3590, Estados Unidos) foi sensibilizada com anticorpo de captura na proporção 1:250 e diluído em tampão carbonato (0,1M de NaCO₃, pH 9,5), “overnight” a 4°C. No dia seguinte, o bloqueio foi realizado com reagente de ensaio (PBS a 10% de soro bovino fetal), por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T, a curva padrão foi preparada, iniciando em 500pg/ml e posteriormente as amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente.

Em seguida, a placa foi incubada com anticorpo de detecção na proporção de 1:250 diluído em reagente de ensaio, juntamente com conjugado de estreptavidina/peroxidase (1:250) por 1 hora a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e posteriormente lavadas com PBS-T. Adicionou-se o substrato tampão TMB (Tetrametilbenzidina) (BD Biosciences, Estados Unidos), por 20 minutos ao abrigo da luz. Após revelação da reação, foi adicionada solução de H₂SO₄ a 0,5M interrompendo a reação.

3.4.2. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Para a detecção de TNF- α (BD optEIA, Estados Unidos), uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura na proporção de 1:250, diluído em tampão carbonato, “overnight” a 4°C. No segundo dia de reação, foi realizado o bloqueio com reagente de ensaio, durante 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente lavada com PBS-T. Imediatamente, a curva foi preparada com diluição inicial de 500pg/ml e as amostras foram adicionadas e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente.

Na sequência, a placa foi incubada com anticorpo de detecção na proporção de 1:500 diluído em reagente de ensaio, juntamente com conjugado de estreptavidina/peroxidase

(1:250) por 1 hora a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e lavadas novamente. Foi adicionado TMB durante 20 minutos a temperatura ambiente e evitando o contato com a luz até a revelação da reação e, então adicionou-se H_2SO_4 0,5M na placa para interromper a reação.

3.4.3. Interleucina 10 (IL-10)

Para a detecção de IL-10 (R&D Systems, Estados Unidos), uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura a 2 μ g/ml em PBS, “overnight” a temperatura ambiente. No dia seguinte, a placa foi lavada com PBS-T (PBS + Tween 0,05%) e posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS mais BSA a 1% (soro albumina bovina) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) por 1 hora, a temperatura ambiente e novamente lavadas em PBS-T. Logo, os pontos da curva padrão de IL-10 foram preparados, iniciando em 4000pg/ml diluído em PBS+BSA 1% e logo após as amostras foram colocadas na placa e deixadas por 2 horas a temperatura ambiente e então lavadas com PBS-T. Posteriormente a placa foi incubada com anticorpo de detecção a 300ng/ml em PBS+BSA 1% por 2 horas a temperatura ambiente e novamente lavada com PBS-T.

Posteriormente, a placa foi incubada com conjugado estreptavidina/peroxidase, na proporção de 1:200 em RD (1,4% soro bovino delipidizado + PBS-Tween 0,05%) por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e posteriormente lavada com PBS-T. Na sequência, a placa foi incubada com substrato tampão TMB por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Por último, foi utilizado H_2SO_4 2N para parar a reação.

3.4.4. Fator de crescimento transformante beta (TGF- β)

Para a reação de ELISA e detecção de TGF- β (R&D Systems – Estados Unidos), uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura a 2 μ g/ml em PBS, “overnight” a temperatura ambiente. No segundo dia, a placa foi lavada com PBS-T então o bloqueio realizado com PBS a 5% de Tween e 0,05% de azida (NaN_3) a 10% durante 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente lavadas com PBS-T. Cada ponto da curva foi preparado a partir do ponto inicial de 2000pg/ml, diluído em RD, e as amostras ativadas com HCl (1N) e inativadas com $NaOH(1,2M)+HEPES(0,5M)$ e adicionadas de acordo com o “layout” e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e depois lavadas.

A placa foi então incubada com anticorpo de detecção a 300ng/ml em RD durante 2 horas a temperatura ambiente e novamente lavada com PBS-T. Então a placa foi incubada com conjugado estreptavidina/peroxidase, na diluição de 1:200 em RD por 20 minutos a

temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e posteriormente lavada. Após, a placa foi incubada com solução de TMB por 30 minutos a temperatura ambiente e sem contato com a luz. Para finalizar, adicionou-se H₂SO₄ 2N para interromper a reação.

3.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados referentes aos índices de apoptose e infecção, foi realizada a partir do teste paramétrico “One-way ANOVA”, com pós teste “Bonferroni”. Para os resultados de ELISA e do número de parasitos por célula, utilizou-se o teste não paramétrico “Kruskal-Wallis” e pós teste “Dunns”, sendo considerados, em todos os testes, valores estatisticamente significantes quando p< 0,05 (*).

4. RESULTADOS

4.1. Udi1CH-05 e Udi2CH-05 modulam diferentemente a apoptose em células BeWo

Quando células BeWo foram infectadas por Udi1CH-05 por 2 ou 6 horas verificou-se que tanto a condição cultura quanto a *C. callosus*/cultura não apresentaram diferenças significativas no índice de apoptose em relação aos respectivos controles (Figura 4A). As fotomicrografias representativas de células BeWo controle ou infectadas por 2 e 6 horas podem ser visualizadas na figura 4 (B-D e 4E-G, respectivamente).

No período de 12 horas, células BeWo infectadas pela categoria cultura de Udi1CH-05 levou ao aumento no índice de apoptose em células BeWo (média 24,77%, $p<0,05$) em comparação à categoria *C. callosus*/cultura (média 14,88%, $p<0,05$) (Figura 4A). Os índices de apoptose de células BeWo infectadas com a cepa Udi1CH-05, categoria cultura, foram significativamente maiores nos estágios tardios de infecção (12 horas) (média 24,77%, $p<0,05$) que nos estágios iniciais da infecção (2 horas) (média 14,27%, $p<0,05$) (Figura 4A). Podem ser observadas micrografias das condições não infectada e infectada por Udi1CH-05 cultura ou *C. callosus*/cultura por 12 horas na figura 4 (H-J).

A infecção por Udi2CH-05, categoria cultura, levou a um índice significativamente maior da apoptose em células BeWo nos períodos de 2 e 6 horas, sendo que nos estágios iniciais da infecção (2 horas), observou-se média de 23,77% ($p<0,05$) quando comparadas ao controle não infectado (média de 12,88%, $p<0,05$) (Figura 5A). Após 6 horas de infecção, células BeWo infectadas com Udi2CH-05, categoria cultura, apresentaram maiores índices de apoptose (média 29,16%, $p<0,05$) que a categoria *C. callosus*/cultura (média 16,83%, $p<0,05$) ou que o controle (média 13,27%, $p<0,05$) (Figura 5A). Em estágios tardios de infecção pela cepa Udi2CH-05, não foram observadas diferenças significativas no índice de apoptose em relação à condição não infectada (Figura 5A). As fotomicrografias de células BeWo infectadas ou não por Udi2CH-05, cultura ou *C. callosus*/cultura por 2, 6 ou 12 horas estão demonstradas na figura 5 (B-J).

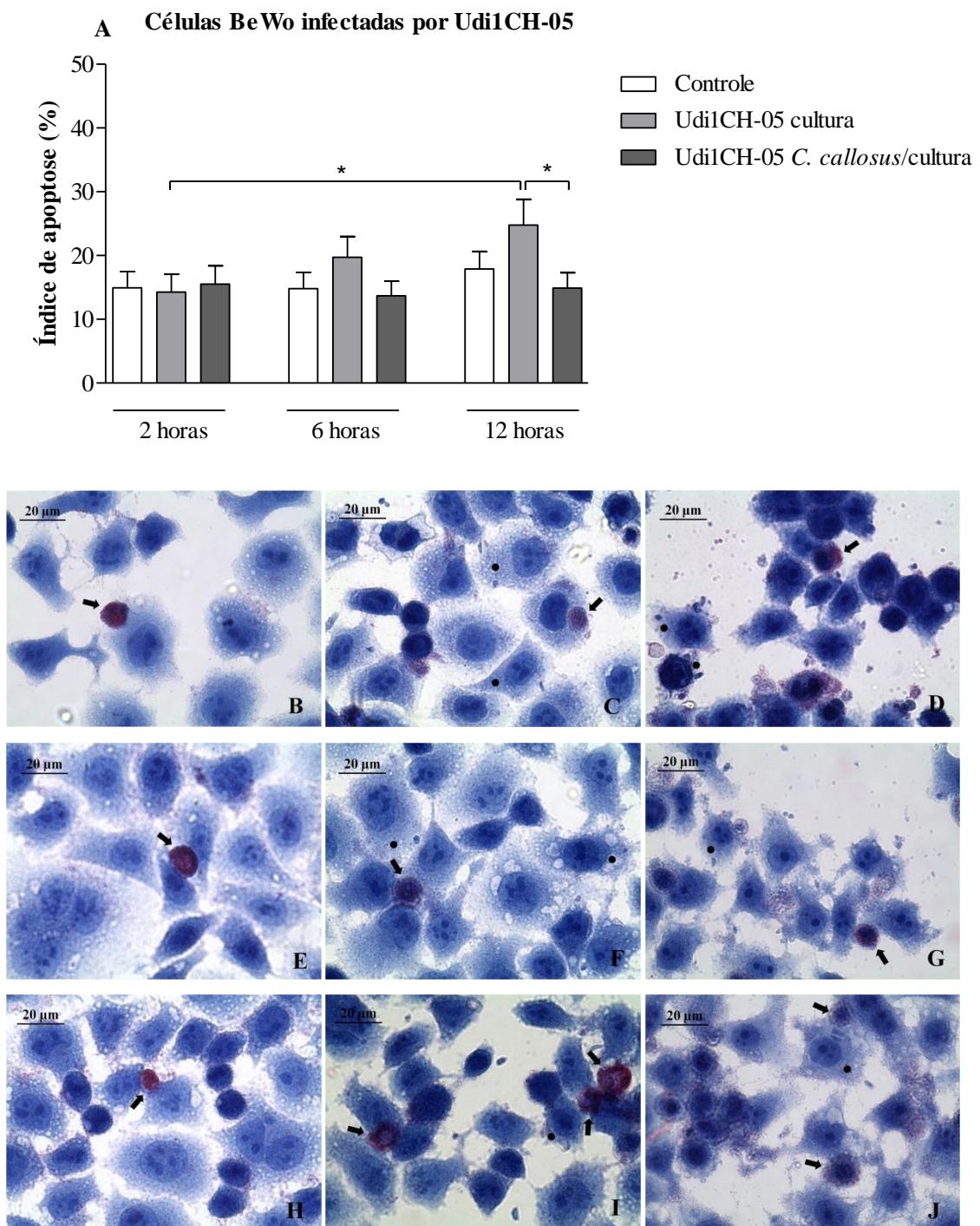


Figura 4: A) Índice de apoptose (%) de células BeWo infectadas pela cepa Udi1CH-05 de *T. gondii*, das condições cultura ou *C. callosus*/cultura, por períodos de 2, 6 ou 12 horas. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$ (*) (Teste “One-way ANOVA”, pós teste “Bonferroni”). B-J) Fotomicrografias de células BeWo infectadas ou não por Udi1CH-05 por períodos de 2, 6 ou 12 horas. As setas (→) indicam as células em apoptose (M30) e os círculos (•) mostram as células infectadas. B, E e H) células BeWo controle (2, 6 e 12 horas respectivamente); C, F e I) células BeWo infectadas por Udi1CH-05 cultura por 2, 6 ou 12 horas respectivamente; D, G e J) células BeWo infectadas por Udi1CH-05 *C. callosus*/cultura durante 2, 6 ou 12 horas especificamente. Barra: 20 μ m.

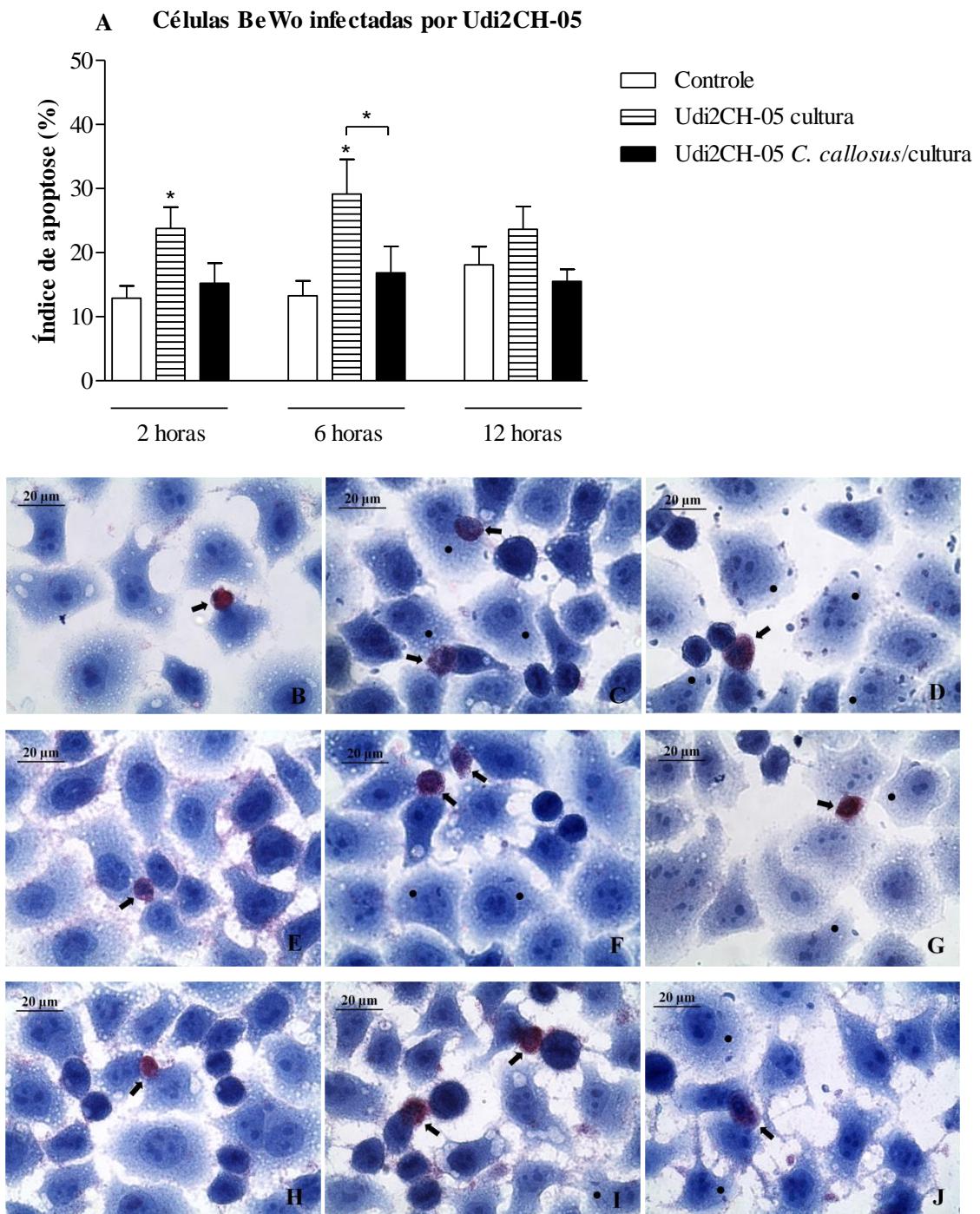


Figura 5: A) Índice de apoptose (%) de células BeWo infectadas pela cepa Udi2CH-05 de *T. gondii*, das condições cultura ou *C. callosus*/cultura, por períodos de 2, 6 ou 12 horas. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$ (*) (Teste “One-way ANOVA”, pós teste “Bonferroni”). B-J) Fotomicrografias de células BeWo infectadas ou não por Udi2CH-05 durante 2, 6 ou 12 horas. As setas (→) indicam as células em apoptose (M30) e os círculos (●) mostram as células infectadas. B, E e H) células BeWo controle (2, 6 e 12 horas respectivamente); C, F e I) células BeWo infectadas pela cepa Udi2CH-05 cultura por 2, 6 ou 12 horas especificamente; D, G e J) células BeWo infectadas por Udi2CH-05 *C. callosus*/cultura durante 2, 6 ou 12 horas especificamente. Barra: 20μm.

4.2. Alteração da susceptibilidade de células BeWo à cepa Udi2CH-05 de acordo com o tempo de infecção

Células BeWo infectadas por Udi1CH-05, categoria cultura ou *C. callosus*/cultura, não apresentaram alterações significativas no índice de infecção em nenhum dos períodos analisados da condição experimental (Figura 6A e figura 4C, D). Células infectadas por Udi1CH-05 cultura ou *C. callosus*/cultura durante 2, 6 ou 12 horas podem ser visualizadas na figura 4 (C-D; F-G; I-J, especificamente).

Células BeWo infectadas por Udi2CH-05 em estágios iniciais de infecção (2 horas) não demonstraram diferenças estatísticas mediante infecção por ambas as categorias da cepa de *T. gondii* (Figura 6B e figura 5C, D). Em estágios intermediários de infecção (6 horas) quando células BeWo foram infectadas com a cepa Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura, verificou-se menor índice de infecção (média de 25,22%, $p<0,05$) quando comparadas com a infecção com a mesma cepa da categoria cultura (média de 32,22%, $p<0,05$) (Figura 6B e figura 5F, G). Em estágios tardios de infecção com a cepa Udi2CH-05, não houve alteração nos índices de infecção de células BeWo, independente da categoria da cepa (cultura ou *C. callosus*/cultura) (Figura 6B).

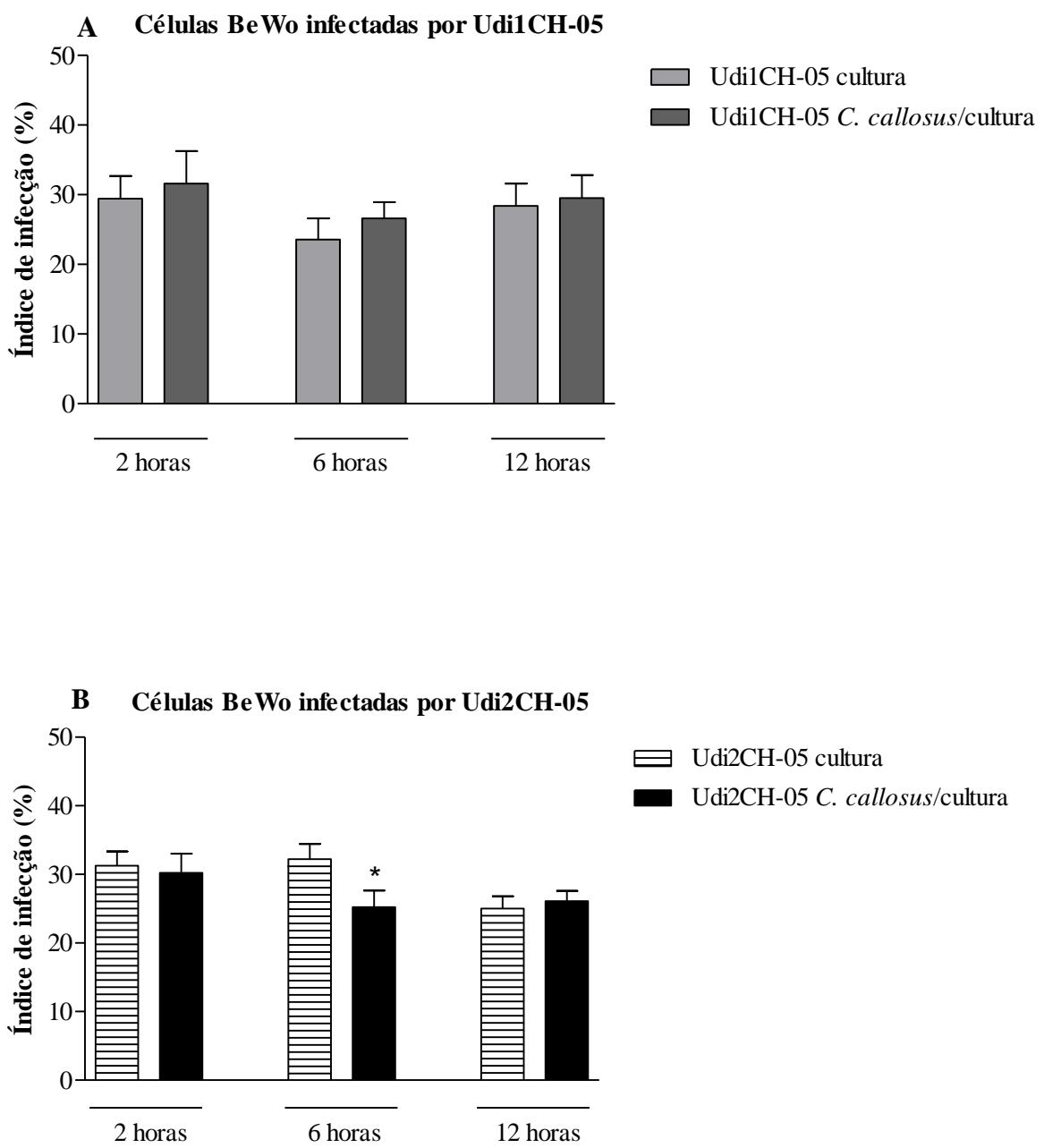


Figura 6: Índice de infecção (%) de células BeWo infectadas por *T. gondii* (3:1). Os dados representam os três experimentos independentes em triplicata, com erro padrão da média. A) Infecção por Udi1CH-05 (cultura ou *C. callosus*/cultura), por 2, 6 ou 12 horas; B) Células BeWo infectadas por Udi2CH-05 das categorias cultura ou *C. callosus*/cultura, durante 2, 6 ou 12 horas. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ (*) (Teste “One-way ANOVA”, pós teste “Bonferroni”).

4.3. O número de parasitos por célula é maior em estágios tardios de infecção pela cepa Udi1CH-05

Quando células BeWo estavam infectadas pela cepa Udi1CH-05, não foram verificadas diferenças significativas entre as categorias cultura ou *C. callosus*/cultura nos períodos de 2 ou 6 horas de infecção (Figura 7A). No período de 12 horas, células infectadas por Udi1CH-05 da categoria *C. callosus*/cultura demonstraram número de parasitos intracelulares significativamente maior em comparação à categoria cultura (médias de 2,13 e 1,42, parasitos, $p<0,05$, respectivamente) (Figura 7A).

Observando-se separadamente cada categoria e em cada tempo de experimento, verificou-se um aumento do número de parasitos por célula quando infectadas por parasitos da categoria cultura por 2 ou 6 horas (médias de 1,19 e 1,20 parasitos, $p<0,05$, respectivamente) em comparação ao período de 12 horas (média de 1,42 parasitos, $p<0,05$), ou por parasitos da categoria *C. callosus*/cultura durante períodos de 2 ou 6 horas (médias de 1,34 e 1,40 parasitos, $p<0,05$, respectivamente) ou 12 horas de infecção (média de 2,13 parasitos, $p<0,05$) (Figura 7A). Fotomicrografias das células infectadas pela cepa Udi1CH-05 cultura ou *C. callosus*/cultura, de todos os períodos analisados, encontram-se na figura 4 (C-D; F-G; I-J, especificamente).

Não houve alterações no número médio de parasitos por células BeWo quando estas foram infectadas com a cepa Udi2CH-05, categoria cultura ou *C. callosus*/cultura, em nenhum dos períodos de infecção analisados (Figura 7B). Micrografias de células BeWo infectadas por Udi2CH-05 das categorias cultura e *C. callosus*/cultura durante 2, 6 ou 12 horas, podem ser visualizadas na figura 5 (C-D; F-G; I-J, respectivamente).

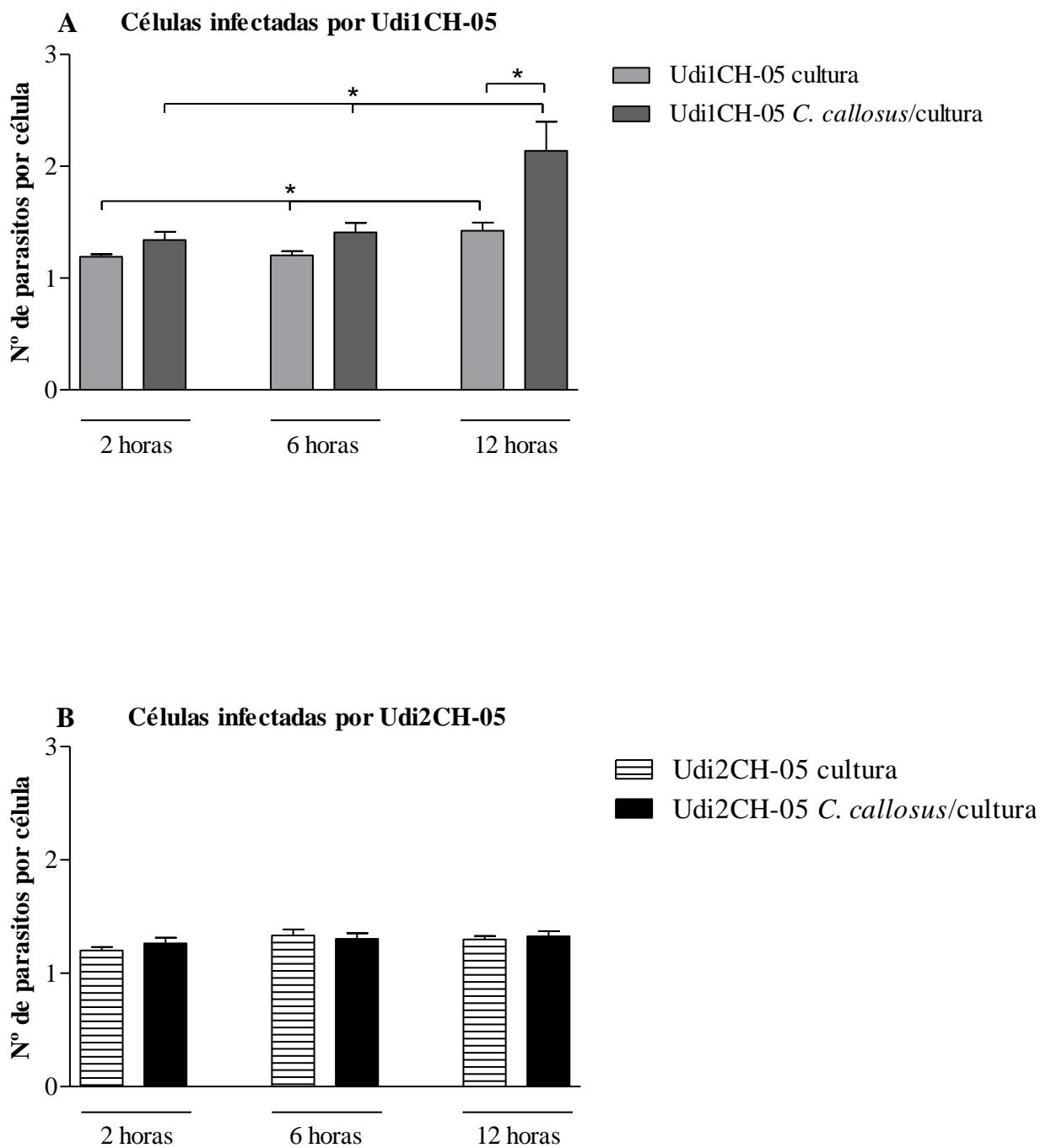


Figura 7: Número médio de parasitos por célula infectada por *T. gondii*, na proporção de 3:1. Dados representativos de três experimentos em triplicata, com erro padrão da média. A) Células BeWo infectadas por Udi1CH-05, categorias cultura e *C. callosus/cultura* durante 2, 6 ou 12 horas; B) Infecção pela cepa Udi2CH-05, categorias cultura e *C. callosus/cultura*, por 2, 6 ou 12 horas. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*) (Teste “Kruskal-Wallis”, pós teste “Dunns”).

4.4. Interleucina-12 é produzida em altos níveis em estágios iniciais e intermediários da infecção por Udi2CH-05

Células BeWo infectadas pela cepa Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura, liberaram maiores níveis de IL-12 nos estágios iniciais de infecção (2 horas) (média 247,9pg/ml, $p<0,05$) quando comparado ao controle (média 50,7pg/ml, $p<0,05$). Em estágio intermediário de infecção, foi possível observar que células BeWo produziram mais IL-12 quando infectadas pela cepa Udi2CH-05, categoria cultura, sendo significativamente maior (média 195,1pg/ml, $p<0,05$) em relação à produção por células BeWo não infectadas (média 42,5pg/ml, $p<0,05$). Em estágio tardio de infecção, observou-se menor produção de IL-12 por células BeWo infectadas pela cepa Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura (média 59,9pg/ml, $p<0,05$), quando comparada com estágio precoce de infecção (2 horas) (média 247,9pg/ml, $p<0,05$) (Figura 8).

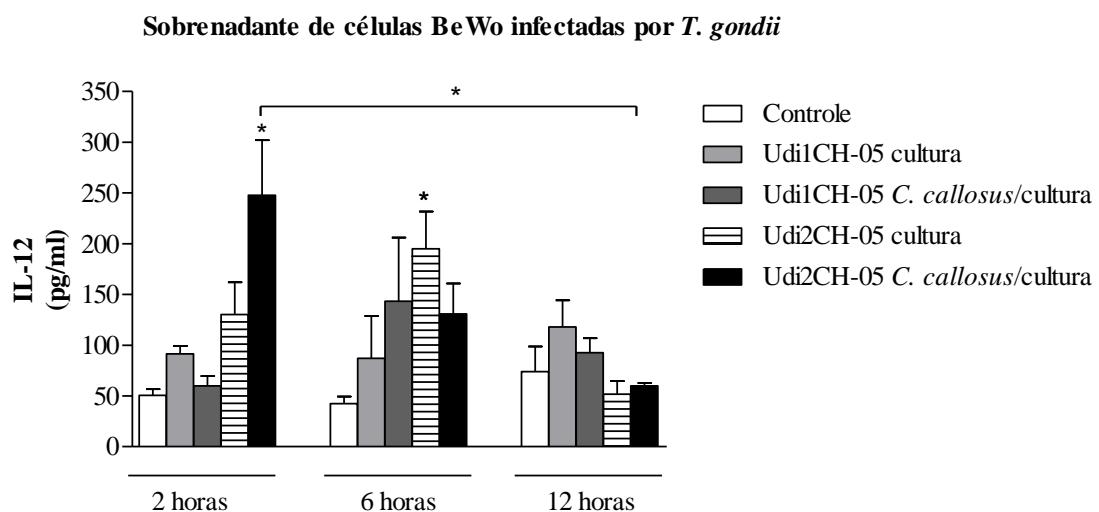


Figura 8: Dados representativos da detecção de IL-12 por ELISA, com erro padrão da média, após células BeWo serem infectadas por Udi1CH-05 ou Udi2CH-05, sendo cultura ou *C. callosus*/cultura, por 2, 6 ou 12 horas. Diferenças significativas quando $p<0,05$ (*)(Teste “Kruskal-Wallis”, pós teste “Dunns”).

4.5. Altos níveis de TNF- α são secretados nos estágios iniciais da infecção por Udi2CH-05

Células BeWo infectadas com a cepa Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura produziram maiores níveis de TNF- α (média 78pg/ml, $p<0,05$) em estágios iniciais de infecção quando comparado à condição controle desse mesmo período (média 17,4pg/ml, $p<0,05$) (Figura 9). Em estágios intermediários (6 horas) de infecção não houve alterações nos níveis desta citocina nas diferentes condições experimentais analisadas (Figura 9).

Quando infectadas pela cepa Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura, células BeWo produziram menores níveis de TNF- α em estágios tardios de infecção (12 horas) em relação aos estágios iniciais de infecção (2 horas) (médias 24,4pg/ml e 78pg/ml, $p<0,05$, respectivamente) (Figura 9).

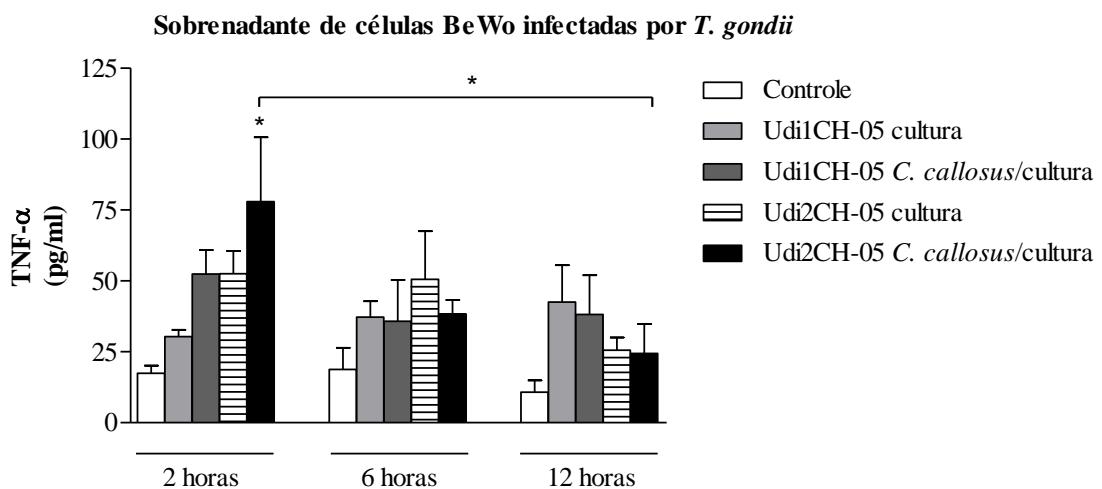


Figura 9: Dados, com erro padrão da média, referentes à detecção de TNF- α em sobrenadantes de células trofoblásticas BeWo infectadas por Udi1CH-05 ou Udi2CH-05, das condições cultura ou *C. callosus*/cultura, por 2, 6 ou 12 horas. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ (*). (Teste “Kruskal-Wallis”, pós teste “Dunns”).

4.6. A infecção por *T. gondii* induz a secreção de IL-10 por células BeWo

A produção de IL-10 por células BeWo infectadas pelas cepas Udi1CH-05 ou Udi2CH-05, nas categorias cultura ou *C. callosus*/cultura, foram maiores em relação à condição não infectada, nos três momentos de observação (2, 6 e 12 horas) (Figura 10). Na fase inicial de infecção, 2 horas, observou-se maiores níveis de IL-10 por células BeWo infectadas por Udi1CH-05 *C. callosus*/cultura (média 29,74 pg/ml, $p<0,05$) ou Udi2CH-05 *C. callosus*/cultura (média 29,9 pg/ml, $p<0,05$) quando comparadas com a condição controle (média 24,87 pg/ml, $p<0,05$) (Figura 10). Após 6 horas de infecção, somente a células BeWo infectadas por Udi2CH-05 das condições cultura (média 31,02 pg/ml, $p<0,05$) e *C. callosus*/cultura (média 32,74 pg/ml, $p<0,05$), apresentaram aumento significativo na produção de IL-10 em relação ao controle (média 24,1 pg/ml, $p<0,05$) (Figura 10).

Em estágios tardios de infecção (12 horas), verificou-se que houve aumento significativo na produção de IL-10 por células BeWo quando infectadas por Udi1CH-05 *C. callosus*/cultura (média 27,79 pg/ml, $p<0,05$) ou Udi2CH-05 cultura (média 29,32 pg/ml, $p<0,05$) ou ainda Udi2CH-05 *C. callosus*/cultura (média 29,54 pg/ml, $p<0,05$) quando comparadas ao controle do período de 12 horas (média 23,62 pg/ml, $p<0,05$) (Figura 10).

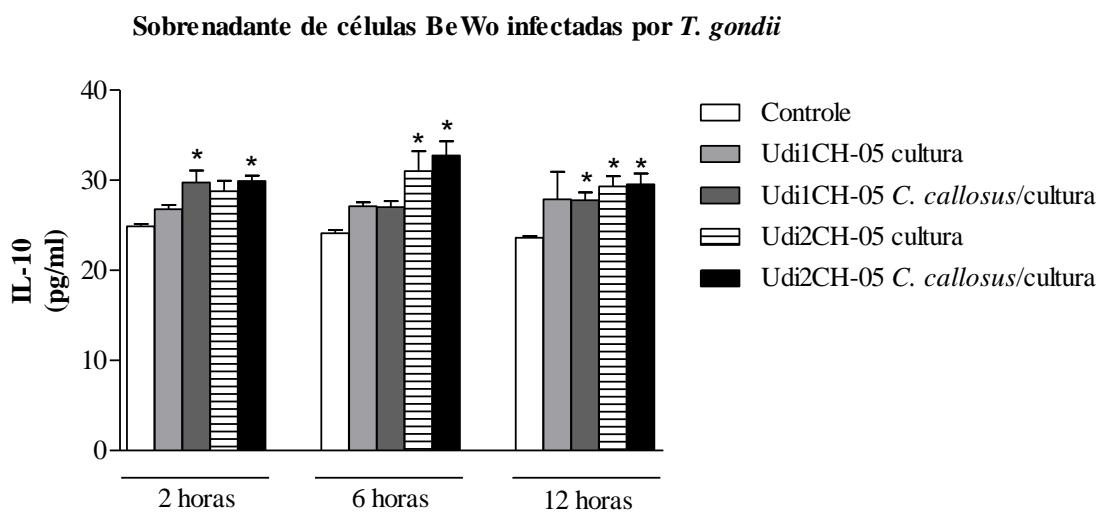


Figura 10: Dados, com erro padrão da média, relativos à detecção de IL-10 por ELISA mediante infecção de células BeWo por Udi1CH-05 ou Udi2CH-05, cultura ou *C. callosus*/cultura, por 2, 6 ou 12 horas. Diferenças significativas quando $p<0,05$ (*) (Teste “Kruskal-Wallis”, pós teste “Dunns”).

4.7. A produção de TGF- β é modulada negativamente pela infecção por Udi1CH-05 cultura em estágios tardios da infecção

A avaliação da produção de TGF- β por células BeWo, nos três momentos de infecção, revelou níveis semelhantes desta citocina em todas as condições experimentais analisadas (Figura 11). Contudo, verificou-se diminuição da produção da citocina no sobrenadante de células BeWo infectadas pela condição cultura da cepa Udi1CH-05 em estágios tardios de infecção (12 horas) (média 136,46 pg/ml, $p < 0,05$) quando comparado com estágios iniciais de infecção (2 horas) (média 153,08 pg/ml, $p < 0,05$) (Figura 11).

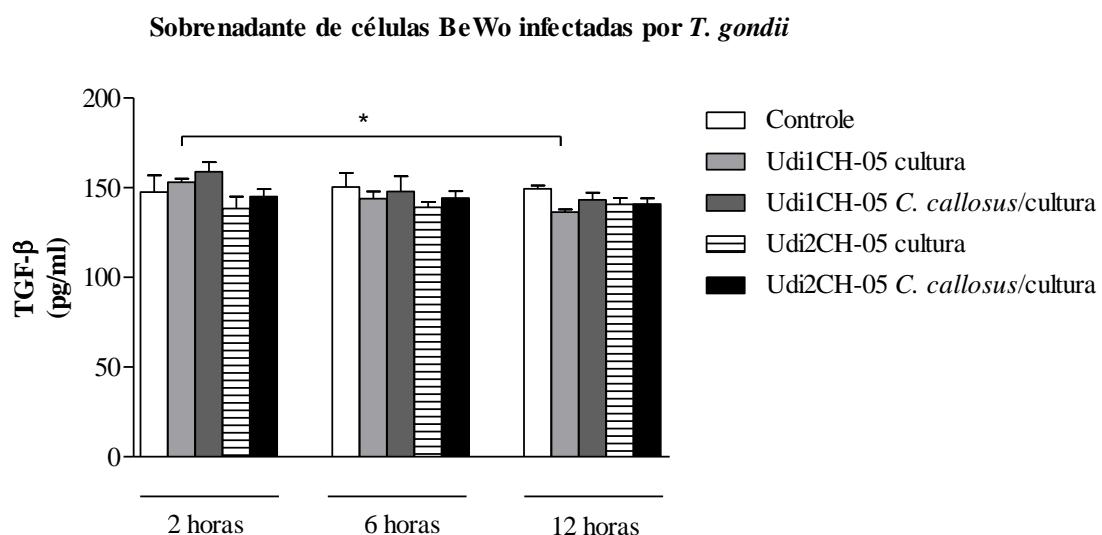


Figura 11: Dados com erro padrão da média, referentes à detecção da produção de TGF- β por ELISA em sobrenadantes de células BeWo infectadas por Udi1CH-05 ou Udi2CH-05, sendo cultura ou *C. callosus*/cultura, durante 2, 6 ou 12 horas. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ (*) (Teste “Kruskal-Wallis”, pós teste “Dunns”).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se a capacidade de modulação da apoptose em células BeWo por cepas exóticas Udi1CH-05 e Udi2CH-05 (SALOMÃO et al., 2007) quando mantidas somente em cultura ou após entrarem em contato com um hospedeiro intermediário, como o roedor *C. callosus*, e posteriormente acondicionadas por curto espaço de tempo em cultura.

T. gondii induz de maneira notável modificações na célula hospedeira, tais como o remodelamento do citoesqueleto ao redor do vacúolo parasítóforo e a reorganização de organelas (RODRIGUES et al., 2012). *T. gondii* pode induzir ou inibir a cascata de sinalização da apoptose por diversas vias que poderiam ser ativadas durante a infecção, sendo que o bloqueio da morte celular protege o parasito à medida que dificulta a rápida atuação dos macrófagos, os quais são ativados por sinalização de células apoptóticas (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

Neste estudo observou-se a aumento do índice de apoptose em células infectadas por Udi1CH-05 da categoria cultura a partir de doze horas de infecção em comparação à categoria *C. callosus*/cultura no mesmo período, e em comparação à categoria cultura desta cepa no período de duas horas.

A modulação positiva da apoptose provavelmente relaciona-se com a interferência na hierarquia funcional das cascadas de sinalização celular responsáveis pelo controle da apoptose, as quais são dependentes dos diferentes graus de virulência do parasito. Nossos resultados mostram que parasitos que não tiveram contato com o hospedeiro *C. callosus* evidenciam seu potencial de induzir a apoptose em células BeWo, promovendo a morte também do parasito. Esses resultados estão de acordo com resultados de Angeloni e colaboradores (2009) que verificaram que a infecção de células BeWo ou HeLa pela cepa ME49, de moderada virulência, promoveu altos níveis de apoptose quando comparado com a infecção por RH, de alta virulência, bem como o controle não infectado.

Quanto à infecção por Udi2CH-05, a indução da morte celular por apoptose ocorre desde os estágio iniciais e intermediários da infecção pela categoria cultura desta cepa em relação ao controle. De maneira semelhante à infecção por Udi1CH-05, a condição *C. callosus*/cultura de Udi2CH-05 não foi capaz de modular a apoptose em nenhum dos períodos observados.

Angeloni e colaboradores (2009) mostraram que o índice de apoptose diminuiu quando células BeWo ou HeLa foram infectadas pela cepa RH numa proporção de cinco parasitos por célula, por doze horas, enquanto que a infecção de células BeWo pela cepa ME49, uma cepa tipo II, apresentaram maior índice de apoptose em relação à cepa RH, sugerindo que parasitos de alta virulência são hábeis em induzir modificações na célula hospedeira para garantir a

sobrevida da célula e, consequentemente, sua própria sobrevivência. Por outro lado, células infectadas por uma cepa de virulência moderada induziriam a apoptose sugerindo que o controle da apoptose relaciona-se com a cepa do parasito e com o tempo de infecção, fenômenos estes que podem ser preponderantes em casos de toxoplasmose congênita (ANGELONI et al., 2009). No pesente estudo observamos que a morte celular foi modulada positivamente pela condição cultura de Udi1CH-05 ou de Udi2CH-05, sugerindo que provavelmente ocorram alterações na virulência entre as condições cultura e *C. callosus*/cultura.

Estudos *in vivo* sugerem que a infecção por cepas do tipo II poderia representar uma ameaça menor em comparação à infecção por uma cepa virulenta como RH, uma vez que a infecção por cepa tipo I promoveria a diminuição da apoptose e, consequentemente, permitiria a permanência do parasito no hospedeiro, enquanto um menor índice de apoptose durante infecções por cepas virulentas contribuiria para a indução de uma resposta inflamatória mais intensa (ASCHKENAZI et al., 2002). Cepas do tipo I de *T. gondii*, são extremamente virulentas em camundongos, o que é atribuído em parte, à evasão de mecanismos de morte mediados por IRGs que eliminariam parasitos tipo I (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). Camundongos infectados por RH apresentam aumento da apoptose de maneira generalizada no baço a qual foi atribuída aos altos níveis de mediadores proinflamatórios induzidos pela cepa RH (GAVRILESCU; DENKERS, 2003).

A patologia causada por *T. gondii* inclui moléculas específicas que determinam as diferenças entre as cepas do parasito, de maneira que genes do hospedeiro e do parasito interagem de forma imprevisível em modelos murinos e que, cepas consideradas de virulência idêntica podem se comportar de maneiras diferentes no mesmo modelo (DUBEY et al., 2012a). Diferentes cepas podem causar patologias diversas em hospedeiros diferentes, tais como camundongos ou humanos (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). Todavia, o parasito precisa conservar a integridade da célula hospedeira para obter nutrientes, pois células apoptóticas induzem autocatabolismo tornando suas macromoléculas disponíveis para células vizinhas e fagócitos (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Cepas distintas de *T. gondii* podem bloquear a apoptose e por diferentes vias e estudos sugerem que as proteínas de roptria ROP18 e ROP16 podem estar relacionadas com a capacidade do parasito em modular a apoptose no hospedeiro (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

O índice de infecção por Udi1CH-05 não sofre modificações quando se compara as procedências do parasito (cultura e *C. callosus*/cultura). O número de parasitos por célula mostra que quanto maior o tempo de infecção maior o tempo para proliferação na célula

hospedeira, fato observado ao comparar os três tempos de infecção, nos quais o número de parasitos por célula aumentou proporcionalmente com o tempo de contato das células com o parasito. De acordo com Melo, Jensen e Saiej (2011), no intuito de sobreviver e se propagar *in vivo*, *T. gondii* precisa converter do estágio taquizoíta para o bradizoíta, o que significa que a virulência elevada poderia levar à morte do hospedeiro, o que não seria vantajoso para o parasito do ponto de vista evolutivo.

A taxa de infecção pela cepa Udi2CH-05 é semelhante em ambas as condições no período de duas horas de infecção, entretanto na infecção durante seis horas verifica-se que há diminuição desse índice somente da condição *C. callosus*/cultura, demonstrando que o comportamento da categoria *C. callosus*/cultura é diferente à medida que prossegue a infecção. Esse comportamento se mantém no período de doze horas, tanto para categoria cultura quanto a categoria *C. callosus*/cultura de Udi2CH-05, sugerindo uma diminuição da susceptibilidade de células BeWo ao parasito. Na presença de parasitos intracelulares obrigatórios tais como *T. gondii* que necessitam da célula hospedeira para que possam completar o ciclo de vida, a virulência não determina somente a capacidade de infectar as células do hospedeiro, mas sim a capacidade de provocar maior ou menor gravidade da doença (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012).

Quando células BeWo foram infectadas por Udi2CH-05, o número de parasitos por célula foi semelhante em todos os tempos de infecção. De acordo com Dubremetz e Lebrun (2012), após a invasão da célula hospedeira, a evasão ou a modulação de uma resposta imune envolvem parâmetros de virulência entre cepas de *T. gondii*, os quais regulam a capacidade de proliferação ou de propagação para outros hospedeiros, interferindo em fatores de transcrição relacionados à sinalização celular (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Assim, é provável que a infecção de células BeWo pela cepa Udi2CH-05 possa alterar o índice de apoptose independente de sua capacidade de proliferação intracelular.

A proteína de roptria 5 (ROP5) em cepas tipo I contribui para alta virulência do parasito em camundongos devido a ativação de outras ROP quinases, tal como ROP18, alterando a oligomerização de IRGs, permitindo que cepas do tipo I evadam dos mecanismo antimicrobianos do hospedeiro (HUNTER; SIBLEY, 2012). ROP5 está envolvida com a virulência de *T. gondii* sendo encontradas diferentes isoformas nos tipos clonais do parasito (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). As isoformas virulentas de ROP5 são encontradas em cepas do tipo I e do tipo III, o que sugere que ROP5 requer outros fatores que não estão presentes em cepas do tipo III para que o parasito demonstre alta virulência, pois quando cepas do tipo III são complementadas com a isoforma ROP18_I, a mesma encontrada em parasitos de alta

virulência, são tão virulentas quanto as do tipo clonal I (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). ROP16 pode influenciar a via JAK / STAT, e, na verdade, os estudos *in vitro* determinaram que essa proteína em cepas tipo I e III, mas não do tipo II, pode manter a ativação constitutiva de STAT3 e STAT6, envolvidas na resposta imune do hospedeiro (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011).

Estudos demonstraram que cepa do tipo II induz a ativação de NF-κB, diferentemente de cepas do tipo I ou III, sendo confirmado que GRA15, um componente de grânulos densos envolvido na determinação da virulência, secretado por cepas do tipo II era o responsável pela ativação de NF-κB (ROSOWSKI et al., 2011) e, a deleção de GRA15 em cepas tipo II como ME49 previnem a translocação nuclear de NF-κB, um elemento chave na resposta imune inata e adaptativa (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Dogruman-Al e colaboradores (2011) sugerem que a resposta imune contra *T. gondii* é complexa podendo variar em diferentes hospedeiros, mas o resultado de uma infecção pelo parasito depende do balanço entre citocinas proinflamatórias tais como IL-12, IFN-γ e TNF-α, que irão suprimir a proliferação do parasito; e citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e IL-27, para controlar a resposta inflamatória.

A produção de IL-12 por células dendríticas está envolvida na indução da produção de TNF-α por macrófagos, enquanto IFN-γ é secretada como resposta imediata a infecção por *T. gondii* (HUNTER; SIBLEY, 2012). Neste trabalho observou-se que células BeWo infectadas por Udi1CH-05 categoria cultura ou categoria *C. callosus*/cultura demonstraram baixa produção de IL-12 nos estágios iniciais da infecção, com aumento moderado com o progredir da infecção. Sabe-se que citocinas proinflamatórias tem o potencial de causar danos ao parasito e consequentemente à célula hospedeira. Entretanto, quando infectadas por Udi2CH-05, verificou-se alta produção de IL-12 na fase inicial e intermediária de infecção, diminuindo nos estágios tardios.

O pico da produção de IL-12 ocorre na fase inicial da infecção por Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura, e diminuem ao longo da infecção, enquanto que no período de seis horas verificou-se nível significativamente maior mediante infecção pela cepa Udi2CH-05, categoria cultura. O aumento da secreção de IL-12 no período de seis horas por esta cepa da categoria cultura coincide com o aumento da apoptose no mesmo período. Esses resultados estão de acordo com estudos de Hunter e Sibley (2012) que demonstraram que a produção de IL-12 no início da infecção se faz importante em monócitos, células dendríticas CD8α+, células dendríticas plasmocitóides e neutrófilos, contribuindo para a indução de um sinal ativador para a resposta imune. Além disso, o controle de *T. gondii* requer a produção inicial

da citocina proinflamatória IL-12, que estimula células NK e linfócitos T CD4+ e CD8+ na secreção de IFN- γ (HUNTER; SIBLEY, 2012).

A expressão de diferentes isoformas de ROP16 em cada tipo clonal do parasito bem como a capacidade de ativação prolongada de STAT3 e STAT6 por essa proteína induz menor produção de IL-12 e promovem secreção diferencial de citocinas do tipo Th1 (HUNTER; SIBLEY, 2012). Assim, há menor reação inflamatória e redução da patologia, mas que, em contrapartida, permite a sobrevivência do parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012).

A secreção de TNF- α ocorre em resposta a diferentes infecções e relaciona-se com a indução da morte celular por apoptose pela ligação ao receptor de TNF 1 (TNF-R1) (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005; FAHERTY; MAURELLI et al., 2008). Além do trofoblasto, outras células como macrófagos, células NK secretam TNF- α , contribuindo para indução de resposta imune (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005). Neste trabalho, observou-se que a produção de TNF- α ocorre na fase inicial da infecção por Udi2CH-05, categoria *C. callosus*/cultura com diminuição ao decorrer do tempo da condição experimental. Hunter e Sibley (2012) relatam que TNF- α é uma citocina envolvida no controle de *T. gondii* juntamente com o receptor de membrana CD40 em células hospedeiras. Assim, a diminuição da produção de TNF- α com o curso da infecção poderia refletir uma capacidade de controle da resposta imune em células infectadas pela cepa Udi2CH-05 da categoria *C. callosus*/cultura.

Camundogos BALB/c infectados pela cepa RH apresentam altos níveis de IL-12 e IFN- γ circulantes (DOGRUMAN-AL et al., 2011). Células NK estimuladas com IL-12 secretam IFN- γ e citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-15 potencializam a ação de IL-12, estimulando macrófagos pela liberação de óxido nítrico (NO), que possui ação microbicida e microbiostática, contribuindo para o além do bloqueio da replicação do parasito, promovendo assim uma resposta proinflamatória adequada contra *T. gondii* (SILVA; LANGONI, 2009). IFN- γ ativa macrófagos por induzir a produção de TNF- α , promovendo um ciclo de amplificação de sinal da resposta imune (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Deste modo, macrófagos ativados por IFN- γ inibem a replicação do parasito por diferentes mecanismos microbicidas, como a indução de indoleamina 2,3-dioxigenase, que degrada triptofano, fator essencial para a replicação do parasito (DOGRUMAN-AL et al., 2011).

Nossos resultados mostram altos níveis de IL-10 em todas as condições infectadas em relação ao controle. Uma vez que IL-10 está associada com o controle da produção de citocinas proinflamatórias (HUNTER; SIBLEY, 2012), sugerimos que o aumento da produção dessa citocina seja uma tentativa de prevenir danos provocados por uma produção

exacerbada de citocinas proinflamatórias ou ainda, poderia ser um mecanismo de escape do parasito à resposta imune do hospedeiro. A citocina IL-10 é produzida por diferentes células tais como macrófagos e células B, tem como função principal inibir a síntese de IL-1 β , TNF- α e IL-12 por macrófagos, além da modulação da secreção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e células NK (DOGRUMAN-AL et al., 2011). Ao contrário de cepas tipo I, cepas do tipo II induzem ambiente imune protetor no hospedeiro (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Nossos dados mostram que houve um pico de produção de IL-10 por células BeWo infectadas por seis horas com Udi2CH-05 independente da procedência do parasito. Entretanto, no período de seis horas de infecção pela categoria cultura da cepa Udi2CH-05 verificou-se aumento do índice de apoptose em relação ao controle e à categoria *C. callosus*/cultura. De acordo com Dogruman-Al e colaboradores (2011), IL-10 atua no controle da resposta imune e do desenvolvimento da patologia mediante a infecção por *T. gondii*, pois foram encontrados altos níveis de IL-10 e IL-12 no soro de *Mus domesticus* infectados por RH (DOGRUMAN-AL et al., 2011). O aumento da produção de IL-10 não coincide com o aumento do índice de apoptose quando células BeWo foram infectadas pela cepa Udi1CH-05, indicando essa cepa poderia modular a produção de outras citocinas anti-inflamatórias com o objetivo de evadir-se da resposta imune desencadeada no hospedeiro.

Os resultados da detecção de TGF- β demonstraram uma diminuição dessa citocina quando células BeWo foram infectadas pela cepa Udi1CH-05, categoria cultura, no período de doze horas, no qual verificou-se aumento do índice de apoptose em relação à categoria *C. callosus*/cultura e em relação ao período de duas horas, sugerindo que TGF- β não é capaz de induzir mecanismos de controle de resposta imune, e que outras citocinas anti-inflamatórias possam atuar nesse controle durante a infecção por Udi1CH-05, categoria cultura. De acordo com Dogruman-Al e colaboradores (2011), TGF- β 1 é uma citocina anti-inflamatória produzida por todos os tipos celulares que atua na imunorregulação, sendo antagonista de citocinas como TNF- α , IFN- γ , TNF- β 1 e IL-2. Os resultados sugerem que TGF- β se mantém em níveis estáveis durante a infecção por Udi1CH-05, categoria *C. callosus*/cultura e por Udi2CH-05, ambas as categorias, indicando um mecanismo de prevenção de resposta inflamatória acentuada durante a infecção pelas cepas atípicas Udi1CH-05 e Udi2CH-05.

O efeito inibitório de TGF- β 1 na atividade de *T. gondii* ocorre pelo bloqueio de TNF- α , demonstrando uma via essencial de controle dessa citocina na indução da produção de IFN- γ por macrófagos (DOGRUMAN-AL et al., 2011). A ativação de resposta imune sem controle poderia resultar na morte do hospedeiro por carga parasitária excessiva, tal como verificado em camundongos desafiados com a cepa tipo I do parasito (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011).

O perfil de citocinas pode ser modificado de acordo com fatores relacionados ao hospedeiro, com a virulência do parasito e o tempo de infecção (DOGRUMAN-AL et al., 2011).

Assim sendo, as cepas atípicas de *T. gondii*, Udi1CH-05 e Udi2CH-05, demonstraram diferenças na capacidade de indução de morte celular por apoptose, além da susceptibilidade de células trofoblásticas e indução de resposta imune, indicando possíveis graus diferenciados de virulência entre as cepas de *T. gondii* e entre as categorias definidas neste trabalho como cultura e *C. callosus*/cultura. Portanto, se faz necessário investigar as moléculas envolvidas na alteração de virulência que consequentemente modulam mecanismos celulares como a morte celular por apoptose.

6. CONCLUSÕES

- O índice de apoptose é modulado positivamente em células BeWo quando estas estão infectadas pela cepa atípica Udi1CH-05 cultura a partir de doze horas de infecção, e a partir de duas horas de infecção pela cepa Udi2CH-05 da categoria cultura de *T. gondii*, enquanto a categoria *C. callosus*/cultura tanto de Udi1CH-05 quanto de Udi2CH-05 não é capaz de induzir a apoptose até doze horas de infecção.
- Células BeWo são igualmente susceptíveis à cepa Udi1CH-05 em todos os tempos de infecção, permitindo a proliferação do parasito de acordo com o tempo de infecção. O índice de infecção de células infectadas por Udi2CH-05 é modulado negativamente a partir de seis horas de infecção pela categoria *C. callosus*/cultura; e a proliferação desta cepa é controlada por células BeWo desde fases iniciais da infecção.
- A citocina IL-12 é produzida em altos níveis na fase inicial da infecção por Udi2CH-05 *C. callosus*/cultura e em período intermediário pela categoria cultura de Udi2CH-05 caracterizando a resposta inflamatória típica a *T. gondii* e a diminuição gradativa de TNF- α coincide com incapacidade de Udi2CH-05 *C. callosus*/cultura em promover a apoptose em células BeWo. As citocinas IL-10 e TGF- β controlam a resposta imune desde fases precoces da infecção por Udi2CH-05.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. New York, Garland Science, 2008. 1268p.
- ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS pathogens**, United States, v. 1, nº 2, p. e17, Oct. 2005.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, England, v. 34, nº 10, p. 1185-1196, Sep. 2004.
- 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**, England, v. 30, p. 785-791, Jul., 2009.
- ASCHKENAZI, S.; STRASZEWSKI, S.; VERWER, K. M. A.; RUTHERFORD, T.; MOR, G. Differential regulation and function of the Fas/FasL ligand system in human trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, United States, v. 66, nº 6, p. 1853-1861, June 2002.
- BANNAI, H.; NISHIKAWA, Y.; IBRAHIM, H. M.; YAMADA, K.; KAWASE, O.; WATANABE, J.; SUGIMOTO, C.; XUAN, X. Overproduction of the pro-apoptotic molecule, programmed cell death 5, in *Toxoplasma gondii* leads to increased apoptosis of host macrophages. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, Japan, v. 71, nº 9, p. 1183-1189, Sep. 2009.
- BARBOSA, B.F; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clinical and experimental immunology**, England, v. 151, nº 3, p. 536-545, Mar. 2008.
- BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cellular microbiology**, England, v. 13, nº 6, p. 797-805, June 2011.
- BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Denmark, v. 117, nº 5-6, p. 458-476, May 2009.
- BOJAR, I.; SZYMÁNSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*-state of the art. **Annals of agricultural and environmental medicine**, Poland, v. 17, nº 2, p. 209-214, Dec. 2010.
- BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I.D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International journal for parasitology**, England, v. 28, nº 1, p. 3-9, Jan. 1998.

BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. **International journal for parasitology**, England, v. 39, n°8, p. 935-946, July 2009.

BOUGHATTAS, S.; ABDALLAH, R. B.; SIALA, E.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia. **The new microbiologica**, Italy, v. 34, n° 4, p. 413-416, Oct. 2011.

BOYER, K.; HILL, D.; MUI, E.; WROBLEWSKI, K.; KARRISON, T.; DUBEY, J. P.; SAUTTER, M.; NOBLE, A. G.; WITHERS, S.; SWISHER, C.; HEYDEMANN, P.; HOSTEN, T.; BABIARZ, J.; LEE, D.; MEIER, P.; McLEOD, R. Toxoplasmosis Study Group. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States, v. 53, n° 11, p. 1081-1089, Dec. 2011.

BOYLE, J. P.; RADKE, J. R. A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models. **International journal for parasitology**, England, v. 39, n° 8, p. 903-914, July 2009.

BRUNELLE, J. K.; LETAI, A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. **Journal of cell science**, England, v. 122, n° 4, p. 437-441, Feb. 2009.

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**, England, v. 8, n° 4, p. 535-544, Apr. 2006.

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

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Molecular microbiology**, England, v. 64, n° 4, p. 904-916, May 2007.

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. The Differential effect of *Toxoplasma gondii* infection on the stability of BCL2-family members involves multiple activities. **Frontiers in microbiology**, Switzerland, v. 2, n° 1, p. 1-13, 2011.

CARMEN, J. C.; SOUTHARD, R. C.; SINAI, A. P. The complexity of signaling in host-pathogen interactions revealed by the *Toxoplasma gondii*-dependent modulation of JNK phosphorylation. **Experimental cell research**, United States, v. 314, n° 20, p. 3724-3736, Dec. 2008.

CARNEIRO, A. C.; ANDRADE, G. M.; COSTA, J. G.; PINHEIRO, B. V.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. D.; SU, C.; JANUÁRIO, J. N.; VITOR, R. W. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, United States, doi:10.1128/JCM.02502-12. Jan. 2013.

CARRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophrenia bulletin**, United States, v. 33, n° 3, p.745–751, May 2007.

- CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; McCRINDLE, C. M.; CULLOR, J. S. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne pathogens and disease**, United States, v. 8, n° 7, p. 751-762, Jul. 2011.
- CHALLIS, J. R.; LOCKWOOD, C. J.; MYATT, L.; NORMAN, J. E.; STRAUSS III, J. F.; PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. **Reproductive sciences**, United States, v. 16, n° 2, p. 206-215, Feb. 2009.
- CHAPEY, E.; WALLON, M.; DEBIZE, G.; RABILLOUD, M.; PEYRON, F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 48, n° 1, p. 41-45, Jan. 2010.
- CHEN, Y. X.; ALLARS, M.; MAITI, K.; ANGELI, G. L.; ABOU-SEIF, C.; SMITH, R.; NICHOLSON, R. C. Factors affecting cytotrophoblast cell viability and differentiation: Evidence of a link between syncytialisation and apoptosis. **International journal of biochemistry and cell biology**, Netherlands, v. 43, n° 5, p. 821-828, May 2011.
- CHIPUK, J.E.; BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell death and differentiation**, England, v. 13, n° 8, p. 1396-1402, Aug. 2006.
- CIARDELLI, L.; MERONI, V.; AVANZINI, M. A.; BOLLANI, L.; TINELLI, C.; GAROFOLI, F.; GASPARONI, A.; STRONATI, M. Early and accurate diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric infectious disease journal**, United States, v. 27, n° 2, p. 125-129, Feb. 2008.
- CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite immunology**, England, v. 29, n° 12, p. 651-660, Dec. 2007.
- CROCKER, I. P.; COOPER, S.; ONG, S. C.; BAKER, P. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. **The American journal of pathology**, United States, v. 162, n° 2, p. 637-643, Feb. 2003.
- DELAIR, E.; LATKANY, P.; NOBLE, A. G.; RABIAH, P.; McLEOD, R.; BRÉZIN, A. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. **Ocular immunology and inflammation**, England, v. 19, n° 2, p. 91-102, Apr. 2011.
- DELHAES, L.; AJZENBERG, D.; SICOT, B.; BOURGEOT, P.; DARDÉ, M. L.; DEI-CAS, E.; HOUFLIN-DEBARGE, V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. **Prenatal diagnosis**, England, v. 30, n° 9, p. 902-905, Sep. 2010.
- DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; MAUBON, D.; DJOSSOU, F.; PANCHOE, D.; PUNWASI, W.; VALERY, N.; PENEAU, C.; DAIGRE, J. L.; AZNAR, C.; COTTRELLE, B.; TERZAN, L.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clinical infectious diseases: an**

official publication of the Infectious Diseases Society of America, United States, v.45, n° 7, p. 88-95, Oct. 2007.

Di CRISTINA, M.; MAROCCO, D.; GALIZI, R.; PROIETTI, C.; SPACCAPELO, R.; CRISANTI, A. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into bradyzoites and tissue cyst formation *in vivo*. **Infection and immunity**, United States, v. 76, n° 8, p. 3491-3501, Aug. 2008.

DOGRUMAN-AL, F.; FIDAN, I.; CELEBI, B.; YESILYURT, E.; ERDAL, B.; BABUR, C.; KUSTIMUR, S. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, Singapore, v. 4, n° 1, p. 16-19, Jan. 2011.

DUBEY, J. P.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; McLEOD, R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, England, v. 139, n° 1, p. 1-13, Jan. 2012a.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, England, v. 10, p. 1-50, Jul. 2012b.

DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, France, v. 14, n° 15, p. 1403-1410, Dec. 2012.

EGAN, C. E.; SUKHUMAVASI, W.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. **Clinical and experimental immunology**, England, v. 156, n° 1, p. 17-24, Apr. 2009.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YEAR, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 199, n° 2, p. 280-285, Jan. 2009.

EWEN, C. L.; KANE, K. P.; BLEACKLEY, R. C. A quarter century of granzymes. **Cell death and differentiation**, England, v. 19, n° 1, p. 28-35, Jan. 2012.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **The Journal of clinical investigation**, United States, v. 101, n° 4, p. 890-898, Feb. 1998.

FAHERTY, C. S.; MAURELLI, A. T. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. **Trends in microbiology**, England, v. 16, n° 4, p. 173-180, Apr. 2008.

FALSCHLEHNER, C.; EMMERICH, C. H.; GERLACH, B.; WALCZAK, H. Trail signaling: decisions between life and death. **International journal of biochemistry and cell biology**, Netherlands, v. 39, n° 7-8, p. 1462-1475, Feb. 2007.

FATOOGHI, A. F.; COZON, G. J.; WALLON, M.; KAHI, S.; GAY-ANDRIEU, F.; GREENLAND, T.; PEYRON, F. Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology.**, Germany, v. 22, n° 3, p. 181-184, Mar. 2003.

FENTRESS, S. J.; BEHNKE, M. S.; DUNAY, I. R.; MASHAYEKHI, M.; ROMMEREIM, L. M.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; TAYLOR, G. A.; TURK, B. E.; LICHTI, C. F.; TOWNSEND, R. R.; QIU, W.; HUI, R.; BEATTY, W. L.; SIBLEY, L. D. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell host and microbe**, United States, v. 8, n° 6, p. 484-495, Dec. 2010.

FUENTES-PRIOR, P.; SALVESEN, G.S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. **The Biochemical journal**, England, v. 384, n° 2, p. 201-232, Dec. 2004.

GALLUZZI, L.; BRENNER, C.; MORSELLI, E.; TOUAT, Z.; KROEMER, G. Viral control of mitochondrial apoptosis. **PLoS pathogens**, United States, v. 4, n° 5, e1000018, May 2008.

GARCIA-MÉRIC, P.; FRANCK, J.; DUMON, H.; PIARROUX, R. Management of congenital toxoplasmosis in France: current data. **La Presse médicale**, France, v. 39, n° 5, p. 530-538, May 2010.

GAVRILESCU, L. C.; DENKERS, E. Y. Interleukin-12 p40- and Fas Ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, United States, v. 71, n° 5, p. 2577-2583, May 2003.

GILBERT ,R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E.; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS neglected tropical diseases**, United States, v. 2, n° 8, e277, Aug. 2008.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v. 1757, n° 5-6, p. 639-647, May-June 2006.

GOLDSTEIN, J. C.; WATERHOUSE, N. J.; JUIN, P.; EVAN, G. I.; GREEN, D. R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature cell biology**, England, v. 2, n° 3, p. 156-162, Mar. 2000.

GONZALVEZ, F.; ASHKENAZI, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. **Oncogene**, England, v. 29, n° 34, p. 4752-4765, Aug. 2010.

GRIGG, M. E.; SUNDAR, N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. **International journal for parasitology**, England, v. 39, n° 8, p. 925-933, July 2009.

GRUSLIN, A.; QIU, Q. X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and the regulation of apoptosis during human placental development. **Biology of reproduction**, United States, v. 64, n° 4, p. 1264-1272, Apr. 2001.

GUGLIETTA, S.; BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BUFFOLANO, W.; DEL PORTO, P.; GARGANO, N. Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, France, v. 9, n° 2, p. 127-133, Feb. 2007.

GUICCIARDI, M.E.; LEIST, M.; GORES, G.J. Lysosomes in cell death. **Oncogene**, England, v. 23, n° 16, p. 2881-2890, Apr. 2004.

GULLER, S.; LACHAPELLE, L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. **Seminars in reproductive endocrinology**, United States, v. 17, n° 1, p. 39-44, 1999.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological reviews**, England, v. 240, n° 1, p. 297-316, Mar. 2011.

HÅKANSSON, S.; CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The European Molecular Biology Organization journal**, England, v. 20, n° 12, p. 3132-3144, Jun. 2001.

HAMMER, A.; HARTMANN, M.; SEDLMAYR, P.; WALCHER, W.; KOHNEN, G.; DOHR, G. Expression of functional Fas ligand in choriocarcinoma. **American journal of reproductive immunology**, Denmark, v. 48, n° 4, p. 226-234, Oct. 2002.

HARTGERS, F. C.; OBENG, B. B.; VOSKAMP, A.; LARBI, I. A.; AMOAH, A. S.; LUTY, A. J.; BOAKYE, D.; YAZDANBAKSH, M. Enhanced Toll-like receptor responsiveness associated with mitogen-activated protein kinase activation in *Plasmodium falciparum*-infected children. **Infection and immunity**, United States, v. 76, n° 11, p. 5149-5157, Nov. 2008.

HIEBERT, P. R.; GRANVILLE, D. J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends in molecular medicine**, England, v. 18, n° 12, p. 732-741, Dec. 2012.

HILL, D.; COSS, C.; DUBEY, J. P.; WROBLEWSKI, K.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; MUÑOZ-ZANZI, C.; MUI, E.; WITHERS, S.; BOYER, K.; HERMES, G.; COYNE, J.; JAGDIS, F.; BURNETT, A.; McLEOD, P.; MORTON, H.; ROBINSON, D.; McLEOD, R. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. **The Journal of parasitology**, United States, v. 97, n° 2, p. 328-337, Apr. 2011.

HUNN, J. P.; FENG, C. G.; SHER, A.; HOWARD, J. C. The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, United States, v. 22, n° 1-2, p. 43-54, Feb. 2011.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature reviews. Microbiology**, England, v. 10, n° 11, p. 766-778, Nov. 2012.

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J. C. P. Apoptosis and its role in the trophoblast. **American journal of obstetrics and gynecology**, United States, v. 195, n° 1, p. 29-39, July 2006.

JAMES, E. R.; GREEN, D. R. Modulation of apoptosis in the host-parasite interaction. **Trends in parasitology**, England, v. 20, n° 6, p. 280-287, June 2004.

KA, H.; HUNT, J. S. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas. **The American journal of pathology**, United States, v. 163, n° 2, p. 413-422, Aug. 2003.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental cell research**, United States, v. 256, n° 1, p. 42-49, Apr. 2000.

KESSLER, H.; HERM-GÖTZ, A.; HEGGE, S.; RAUCH, M.; SOLDATI-FAVRE, D.; FRISCHKNECHT, F.; MEISSNER, M. Microneme protein 8—a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. **Journal of cell science**, England, v. 121, n° Pt7, p. 947-956, Apr. 2008.

KHAMINETS, A.; HUNN, J. P.; KÖNEN-WAISMAN, S.; ZHAO, Y. O.; PREUKSCHAT, D.; COERS, J.; BOYLE, J. P.; ONG, Y. C.; BOOTHROYD, J. C.; REICHMANN, G.; HOWARD, J. C. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. **Cellular microbiology**, England, v. 12, n° 7, p. 939-961, Jul. 2010.

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

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J. P.; DARDE, M. L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 104, n° 37, p. 14872-14877, Sep. 2007.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; TOGE, T. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. **Cancer**, United States, v. 100, n° 11, p. 2281-2291, June 2004.

KOZMAR, A.; GREENLEE-WACKER, M. C.; BOHLSON, S. S. Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. **Journal of innate immunity**, Switzerland, v. 2, n° 3, p. 248-259, Mar. 2010.

LALIBERTÈ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and molecular life sciences**, Switzerland, v. 65, n° 12, p.1900–1915, June 2008.

LALIER, L.; CARTRON, P. F.; JUIN, P.; NEDELKINA, S.; MANON, S.; BECHINGER, B.; VALLETTE, F. M. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, United States, v. 12, n° 5, p. 887–896, May 2007.

LECORDIER, L.; MERCIER, C.; SIBLEY, L. D.; CESBRON-DELAUW, M. F. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. **Molecular biology of the cell**, United States, v. 10, n° 4, p. 1277-1287, Apr. 1999.

LETAI, A.G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. **Nature reviews. Cancer**, England, v. 8, n° 2, p. 121–132, Feb. 2008.

LEVY, R.; NELSON, D. M. To be or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. **Placenta**, England, v. 21, n° 1, p. 1–13, Jan. 2000.

LI, C. F.; GOU, W. L.; LI, X. L.; WANG, S. L.; YANG, T.; CHEN, Q. Reduced expression of survivin, the inhibitor of apoptosis protein correlates with severity of preeclampsia. **Placenta**, England, v. 33, n° 1, p. 47-51, Jan. 2012.

LIMENTAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D. Functional genetics in Apicomplexa: Potentials and limits. **Federation of European Biochemical Societies letters**, Netherlands, v. 585, n° 11, p. 1579-1588, June 2011.

LINDSTRÖM, I.; SUNDAR, N.; LINDH, J.; KIRONDE, F.; KABASA, J. D.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P.; SMITH, J. E. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. **Parasitology**, England, v. 135, Pt 1, p. 39-45, Jan. 2008.

LING, Y. M.; SHAW, M. H.; AYALA, C.; COPPENS, I.; TAYLOR, G. A.; FERGUSON, D. J.; YAP, G. S. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. **The Journal of experimental medicine**, United States, v. 203, n° 9, p. 2063-2071, Sep. 2006.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 4° ed. New York: Scientific American Books, 2002. 1121p.

MARSDEN, V. S.; STRASSER, A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. **Annual review of immunology**, United States, v. 21, p. 71-105, 2003.

MARTENS, S.; HOWARD, J. The interferon-inducible GTPases. **Annual review of cell and developmental biology**, United States, v. 22, p. 559-589. 2006.

MARTENS, S.; PARVANOVA, I.; ZERRAHN, J.; GRIFFITHS, G.; SCHELL, G.; REICHMANN, G.; HOWARD, J. C. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous

vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. **PLoS pathogens**, United States, v. 1, nº 3, e24, Nov. 2005.

MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M-P.; DARDÉ, M-L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends in parasitology**, England, v. 24, nº 7, p. 299–303, July 2008.

McCALL, M. B.; NETEA, M. G.; HERMSEN, C. C.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; GOLENBOCK, D.; van der VEN, A. J.; SAUERWEIN, R. W. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. **The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists**, United States, v. 179, nº 1, p. 162-171, Jul. 2007.

McFADDEN, G. I. The apicoplast. **Protoplasma**, Austria, v. 248, nº 4, p. 641-650, Oct. 2011.

MCLEOD, R., KIEFFER, F., SAUTTER, M., HOSTEN, T. AND PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 104, nº 2, p. 320–344, Mar. 2009.

MEISSNER, M.; REISS, M.; VIEBIG, N.; CARRUTHERS, V. B.; TOURSEL, C.; TOMAVO, S.; AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. **Journal of cell science**, England, v. 115, nº Pt3, p.563–574, Feb. 2002.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in parasitology**, England, v. 27, nº 11, p. 487-495, Nov. 2011.

MENNECHET, F. J.; KASPER, L. H.; RACHINEL, N.; LI, W.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. **The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists**, United States, v. 168, nº 6, p. 2988-2996, Mar. 2002.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, Stanford, v. 363, nº 9425, p. 1965-1976, Jun. 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States, v. 47, nº 4, p. 554-566, Aug. 2008.

NGUYEN, T. D.; BIGAIGNON, G.; MARKINE-GORIAYNOFF, D.; HEREMANS, H.; NGUYEN, T. N.; WARNIER, G.; DELMEE, M.; WARNY, M.; WOLF, S. F.; UYTTEHOVE, C.; Van SNICK, J.; COUTELIER, J. P. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon **Journal of medical microbiology**, England, v.52, Pt 10, p. 869-876, Oct. 2003.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus de L'Academie des Sciences**, France, v. 147, p. 763–766, 1909.

ORSI, N. M.; TRIBE, R. M. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. **Journal of neuroendocrinology**, United States, v. 20, n° 4, p. 462-469, Apr. 2008.

PAN, S.; THOMPSON, R. C.; GRIGG, M. E.; SUNDAR, N.; SMITH, A.; LYMBERY, A. J.; Western Australian marsupials are multiply infected with genetically diverse strains of *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, United States, v. 7, n° 9, e45147, Sep. 2012.

PARK, H. H. Structural features of caspase-activating complexes. **International journal of molecular sciences**, Switzerland, v. 13, n° 4, p. 4807-4818, Apr. 2012.

PAWLOWSKI, N.; KHAMINETS, A.; HUNN, J. P.; PAPIC, N.; SCHMIDT, A.; UTHAIAH, R. C.; LANGE, R.; VOPPER, G.; MARTENS, S.; WOLF, E.; HOWARD, J. C. The activation mechanism of Irga6, an interferon-inducible GTPase contributing to mouse resistance against *Toxoplasma gondii*. **BioMed Central biology**, England, v. 9, n° 7, p. 1-15, Jan. 2011.

PINKOSKI, M. J.; WATERHOUSE, N. J.; GREEN, D. R. Mitochondria, apoptosis and autoimmunity. **Current directions in autoimmunity**, Switzerland, v. 9, p. 55-73, 2006.

POLLARD, A. M.; ONATOLU, K. N.; HILLER, L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, United States, v. 76, n° 1, p. 103-110, Jan. 2008.

POMARES, C.; AJZENBERG, D.; BORNARD, L.; BERNARDIN, G.; HASSEINE, L.; DARDE, M. L.; MARTY, P. Toxoplasmosis and horse meat, France. **Emerging infectious diseases**, United States, v. 17, n° 7, p. 1327-1328, July 2011.

RABILLOUD, M.; WALLON, M.; PEYRON, F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. **The Pediatric infectious disease journal**, United States, v. 29, n° 5, p. 421-425, May 2010.

RAJASHEKHAR, G.; LOGANATH, A.; ROY, A. C.; MONGELLI, J. M. Co-expression of Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand by BeWo and NJG choriocarcinoma cell lines. **Gynecologic oncology**, United States, v. 91, n° 1, p. 101–111, Oct. 2003.

REDLINE, R. W. Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord. **Seminars in fetal and neonatal medicine**, Netherlands, v. 11, n° 5, p. 296-301, Oct. 2006.

REED, J.C.; DOCTOR, K.S.; GODZIK, A. The domains of apoptosis: A genomics perspective. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, United States, v. 2004, n° 234, re9, June 2004.

RIEDL, S.J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v. 5, n° 11, p. 897–907, Nov. 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, United States, v. 25, nº 2, 264-296, Apr. 2012. (Erratum in: **Clinical microbiology reviews**, v. 25, nº 3, p. 583, July 2012.

ROBBINS, S. L. et al. **Basic Pathology**. 8^oed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. 946p.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; OUAISI, A.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. **Cellular microbiology**, England, v. 14, nº 3, p. 325-333, Mar. 2012.

ROSOWSKI, E. E.; LU, D.; JULIEN, L.; RODDA, L.; GAISER, R. A.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **The Journal of experimental medicine**, United States, v. 208, nº 1, p. 195-212, Jan. 2011.

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

SANTOS, J. M.; FERGUSON, D. J.; BLACKMAN, M. J.; SOLDATI-FAVRE, D. Intramembrane cleavage of AMA1 triggers *Toxoplasma* to switch from an invasive to a replicative mode, **Science**, United States, v. 331, nº 6016, p. 473-477, Jan. 2011a.

SANTOS, T. A.; PORTES, J. DE A.; DAMASCENO-SÁ, J. C.; CALDAS, L. A.; SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. **PLoS One**, United States, v. 6, nº 11, e27867, Nov. 2011b.

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K. J.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **The European Molecular Biology Organization journal**, England, v. 17, nº 6, p. 1675–1687, Mar. 1998.

SCHUTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHER, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v. 9, nº 8, p. 655–662, Aug. 2008.

SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 99, nº 1, p. 13-17, Feb. 2004.

SHIN, E. H.; CHUN, Y. S.; KIM, W. H.; KIM, J. L.; PYO, K. H.; CHAI, J. Y. Immune responses of mice intraduodenally infected with *Toxoplasma gondii* KI-1 tachyzoites. **The Korean journal of parasitology**, Korea (South), v. 49, nº 2, p. 115-123, Jun. 2011.

SIBLEY, L. D. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, England, v. 39, nº 8, p. 915–924, July 2009.

- SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual review of microbiology**, United States, v. 62, p. 329–351, 2008.
- SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology research**, Germany, v. 105, n° 4, p. 893-898, Oct. 2009.
- SINAI, A. P.; PAYNE, T. M.; CARMEN, J. C.; HARDI, L.; WATSON, S. J.; MOLESTINA, R. E. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, England, v. 34, n° 3, p. 381–91, Mar. 2004.
- SPENCER, S. L.; SORGER, P. K. Measuring and Modeling Apoptosis in Single Cells. **Cell**, United States, v. 144, n° 6, p. 926-939, Mar. 2011.
- SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev Soc Scient.**, Brasile, v. 3, p. 109–112. 1908.
- STEINFELDT, T.; KÖNEN-WAISMAN, S.; TONG, L.; PAWLOWSKI, N.; LAMKEMEYER, T.; SIBLEY, L. D.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS biology**, United States, v. 8, n° 12, e1000576, Dec. 2010.
- STRAUB, K.; CHENG, S.; SOHN, C.; BRADLEY, P. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. **Cellular microbiology**, England, v. 11, n° 4, p. 590-603, Apr. 2009.
- STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocrine reviews**, United States, v. 26, n° 7, p. 877–897, Dec. 2005.
- STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M. E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A. H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, Netherlands, v. 217, n° 1, p. 28-36, Jan. 2012.
- SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, England, v. 137, n° 1, p. 1-11, Jan. 2010.
- SULLIVAN Jr., W. J.; SMITH, A. T.; JOYCE, B. R. Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 104, n° 2, p. 155-161, Mar. 2009.
- SULLIVAN, W. J. Jr.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology reviews**, England, v. 36, n° 3, p. 717-733, May 2012.
- TAIT, S.W.; PARSONS, M. J.; LLAMBI, F.; BOUCHIER-HAYES, L.; CONNELL, S.; MUÑOZ-PINEDO, C.; GREEN, D. R. Resistance to caspase-independent cell death requires

persistence of intact mitochondria. **Developmental cell**, United States, v. 18, n° 5, p. 802–813, May 2010.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current opinion in immunology**, England, v. 19, n° 4, p. 430-434, Aug. 2007.

TAYLOR, G. A. IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. **Cellular microbiology**, England, v. 9, n° 5, p. 1099-1107, May 2007.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v. 9, n° 3, p. 231-241, Mar. 2008.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**. England, v. 30, n° 12-13, p. 1217–1258, Nov. 2000 (Erratum in: **International journal for parasitology**, v. 31, n° 2, p. 217-220. Feb., 2001).

THOMADAKI, H.; SCORILAS, A. Molecular profile of the BCL2 family of the apoptosis related genes in breast cancer cells after treatment with cytotoxic/cytostatic drugs. **Connective tissue research**, England, v. 49, n° 3, p. 261-264, 2008.

WALLACE, G. R.; STANFORD, M. R. Immunity and *Toxoplasma* retinochoroiditis. **Clinical and experimental immunology**, England, v. 153, n° 3, p. 309-315, Sep. 2008.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annual review of genetics**, United States, v. 43, p. 95-118, 2009.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International journal for parasitology**, England, v. 39, n° 8, p. 895-901, Jul. 2009.

WENDTE, J. M., MILLER, M. A.; LAMBOURN, D. M.; MAGARGAL, S. L.; JESSUP, D. A.; GRIGG, M. E. Self-mating in the definitive host potentiates clonal outbreaks of the apicomplexan parasites *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii*. **PLoS genetics**, United States, v. 6, n° 12, e1001261, Dec. 2010.

YAMADA, T.; TOMITA, T.; WEISS, L. M.; ORLOFSKY, A. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells. **International journal for parasitology**, England, v. 41, n° 6, p. 595–607, May 2011.

ZHAO, Y. O.; KHAMINETS, A.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFNgamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. **PLoS pathogens**, United States, v. 5, n° 2, e1000288, Feb. 2009.

ZOU, H.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 274, n° 17, p. 11549-11556, Apr. 1999.

ANEXO A – Aceite do Comitê de Ética



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Av. João Naves de Ávila, nº 2121 – Bloco A- sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38408-144 - FONE (034)3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br

Uberlândia, 07 de outubro de 2011.

MI/PROPP/CEP/UFU/063/11

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

Para: Prof^a. Dr^a. Eloisa Amália Vieira Ferro
ICBIM/UFU

Prezada Pesquisadora,

Com respeito ao protocolo registrado no CEP/UFU sob o nº 252/11: “**Detecção da apoptose em células trofoblásticas (linhagem BeWo) infectas com as cepas RH, Udi1CH-05 e Udi2CH-05 de *Toxoplasma gondii***”, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos na Universidade Federal de Uberlândia – CEP/UFU – comunica que pesquisas realizadas com linhagens de células humanas, adquiridas no comércio, não necessitam de avaliação ética pelo Comitê de Ética.

Atenciosamente,

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

ANEXO B – Aceite do Comitê de Ética



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

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

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

Pesquisador Responsável: Eloisa Amália Vieira Ferro

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 05 de julho de 2011

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