

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Influência das citocinas IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ na susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e células epiteliais uterinas humanas (linhagem HeLa) à infecção por *Toxoplasma gondii*: papel na expressão de ICAM-1, na adesão do parasito à célula hospedeira e vias de sinalização intracelulares ativadas

BELLISA DE FREITAS BARBOSA

Uberlândia

Novembro – 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Influência das citocinas IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ na susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e células epiteliais uterinas humanas (linhagem HeLa) à infecção por *Toxoplasma gondii*: papel na expressão de ICAM-1, na adesão do parasito à célula hospedeira e vias de sinalização intracelulares ativadas

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

Aluna: Bellisa de Freitas Barbosa

Orientadora: Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro

Co-orientadora: Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia

Novembro – 2011

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

B238i Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-

Influência das citocinas IL-10, TGF-β1 e IFN-γ na susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e células epiteliais uterinas humanas (linhagem HeLa) à infecção por *Toxoplasma gondii*: papel na expressão de ICAM-1, na adesão do parasito à célula hospedeira e vias de sinalização intracelulares ativadas / Bellisa de Freitas Barbosa. - 2011.

143 f. : il.

Orientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro.

Co-orientadora: Neide Maria da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. I. Ferro, Eloísa Amália Vieira. II. Silva, Neide Maria da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.993.1

Dedicatória

Esta etapa da minha vida foi grandiosa e cheia de obstáculos.

A grandiosidade de mais esta conquista quero compartilhar com meus pais, Maria Carlos de Freitas e João Vieira Barbosa, com minha querida irmã, Julice de Freitas Barbosa, e com minha segunda mãe Abadia Vieira Barbosa. Todos vocês cooperaram para a minha caminhada até aqui e continuam torcendo por mim.

Considero que o Doutorado é apenas o início de uma grande vitória profissional, que ainda está por vir. Espero continuar contando com vocês e me sinto muito segura porque sempre terei os vossos carinhos, respeito, amor e colo quentinho de casa.

Os obstáculos estes tentei não compartilhar com vocês, apesar de às vezes o meu próprio rosto demonstrar as dificuldades. Mas mesmo assim recebi todas as orações e energias positivas que me fizeram continuar caminhando e concluir esta etapa da vida.

Obrigada por tudo!

Agradecimento Especial

Agradeço, de modo especial, à minha orientadora Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro.

Obrigada por me oferecer todas as oportunidades possíveis, desde o aceite como estagiária lá na minha graduação até a conclusão do Doutorado. Foi uma caminhada muito longa....recheada de conquistas....tanto profissionais quanto pessoais. Quem diria que um dia eu pudesse conhecer outro país....obrigada imensamente por essa oportunidade. Jamais esquecerei! Obrigada por confiar em mim e por continuar confiando.

Agradecimentos Fundamentais

Dra. Neide Maria da Silva

Obrigada por me oferecer oportunidades de trabalhar com você. Aprendi muito trabalhando ao seu lado e espero continuar aprendendo. Você é exemplo de ética e amor à pesquisa.

Dra. Luana Ricci Paulesu

Obrigada por me receber no seu laboratório na Universidade de Siena. Foram 6 meses inesquecíveis da minha vida. Conhecer novos ambientes, novos trabalhos, novas pessoas e novas culturas enriquecem qualquer pessoa.

Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Como se diz: “Quando eu crescer quero ser igual a você”. Você é multifatorial, sabe de tudo um pouco. Sempre disposta a ajudar. Obrigada por sempre me ajudar, seja num protocolo, na reconstituição de um reagente ou na escrita de um paper. Obrigada mesmo!

Dr. José Roberto Mineo

Muita competência e inteligência. Obrigada por sempre disponibilizar seu laboratório, pelas grandes ajudas nas submissões de artigos e pelas cooperações. Espero poder continuar contando com sua ajuda, que é indispensável.

Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Obrigada pela sua disposição em sempre me ajudar. Suas contribuições são muito importantes. Obrigada pelas reuniões de discussão, pelo fornecimento de reagentes, pelos auxílios em bancadas e experimentos. Espero poder sempre contar com sua ajuda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado

Agradecimentos aos meus queridos amigos

- ❖ Agradeço as minhas eternas amigas e companheiras de Laboratório: Angelica Gomes, Mariana Bodini, Priscila Franco, Andressinha, Letícia Castro-Filice e Celene. Obrigada pelas ótimas horas de convivência e pelo apoio sempre oferecido
- ❖ Agradeço as minhas grandes amigas de Laboratório e de diversão: Estér Cristina, Rosiane Nascimento, Loyane Coutinho e Nagilla Daliane. Vocês são muito importantes pra mim e me estenderam a mão quando eu mais precisei
- ❖ Agradeço também as amigas Janice Buiate, Mayara Ribeiro, Pâmela Guirelli e Rafaela José. Vocês sempre me ajudaram com boa vontade e sei que posso contar com vocês. Obrigada pelas boas horas de convivência
- ❖ Agradeço aos amigos Jayonta, Antonela, Giusy, Nicoleta, Roberta Romagnoli e Paulo pelos excelentes dias vividos com vocês em Siena
- ❖ Agradeço as amigas Taisa Carrijo, Ananda Vicentini, Rúbia Amorim, Léo Rocha, Rafael Valadão e Thaissa Melo que, mesmo a vida tendo nos afastado, vocês fizeram parte de tudo o que eu sou hoje
- ❖ Agradeço a minha amiga Priscila Amorim, que sempre rezou por mim e sempre me disse palavras de conforto
- ❖ Agradeço aos companheiros do laboratório de Histologia: Fabrício, Juscélia, Marcelo, Mariane e demais professores

Coração de Estudante

*“Quero falar de uma coisa
Adivinha onde ela anda
Deve estar dentro do peito
Ou caminha pelo ar
Pode estar aqui do lado
Bem mais perto que pensamos
A folha da juventude
É o nome certo desse amor
Já podaram seus momentos
Desviaram seu destino
Seu sorriso de menino
Quantas vezes se escondeu
Mas renova-se a esperança
Nova aurora a cada dia
E há que se cuidar do broto
Pra que a vida nos dê Flor, Flores e Fruto*

Coração de Estudante

*Há que se cuidar da vida
Há que se cuidar do mundo
Tomar conta da amizade
Alegria e muito sonho
Espalhados no caminho
Verdes, planta e sentimento
Folhas, coração,
Juventude e fé.”*

Milton Nascimento e Wagner Tiso

Lista de Abreviações

- ABC: complexo avidina biotina
APC: célula apresentadora de antígeno
βHCG: gonadotrofina coriônica humana
BSA: soro albumina bovina
CBA: “Cytometric Bead Array”
Célula NK: célula “natural killer”
COX₂: ciclooxygenase 2
DTT: dithiothreitol
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK: quinase regulada por sinais extracelulares
GAS: seqüência ativadora de gama
GPI: glicosilfosfatidilinositol
GRA: grânulo denso
GTP: guanosídeo trifosfato
ICAM-1: molécula de adesão intercelular tipo 1
IDO: indoleamina 2,3 dioxygenase
IFN- γ : interferon gama
IL-10: interleucina-10
iNOS: óxido nítrico sintase induzível
IRF-1: fator regulador de interferon tipo 1
JAK: janus kinase
LIF: fator inibidor de leucemia
LO: lipoxygenase
LXA₄: lipoxina A4
MCP-1: proteína quimiotática para monócito 1
MHC: molécula de histocompatibilidade
MIC-2: proteína de micronema tipo 2
MIF: fator de inibição da migração de macrófagos
M2AP: proteína acessória de MIC-2
MyD88: “myeloid differentiation primary response gene 88”
NaF: fluoreto de sódio
Na₃VO₄: ortovanadato de sódio

NF-κB: fator de transcrição nuclear
PBMC: célula mononuclear do sangue periférico
PBS: salina tamponada com fosfato
PE: ficoeritrina
PVDF: “Polyvinylidene fluoride”
ROP: roptria
SAG: antígeno de superfície
SOCS: proteína supressora da sinalização de citocinas
STAg: antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*
TBS: salina tamponada com Tris
STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGF-β1: fator transformador de crescimento beta 1
TLR: “toll like receptors”
TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
TyK2: tirosina kinase tipo 2

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : mecanismos de invasão da célula hospedeira e formas de infecção.....	16
1.2. Mecanismos de adesão e invasão da célula hospedeira.....	18
1.3. Resposta imune a <i>T. gondii</i> e mecanismos de evasão do parasito.....	20
1.4. <i>T. gondii</i> na interface materno-fetal.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
CAPÍTULO I.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1. Manutenção de células BeWo e HeLa em cultura.....	35
2.2. Manutenção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da cepa RH de <i>T. gondii</i>	36
2.3. Infecção de células BeWo e HeLa por <i>T. gondii</i> e tratamento com citocinas.....	36
2.4. Imuno-histoquímica para ICAM-1.....	38
2.5. Western blotting para ICAM-1.....	39
2.6. Reação em cadeia de polimerase quantitativa (PCR) para ICAM-1.....	41
2.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para TNF- α	41
2.8. Influência de ICAM-1 na adesão de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HeLa.....	42
2.9. Análise estatística.....	44
3. RESULTADOS.....	45
3.1. Células BeWo apresentam maior expressão de ICAM-1, independentemente da infecção por <i>T. gondii</i>	45
3.2. Tratamento com rTGF- β 1 e rIL-10 induzem aumento do índice de infecção em células BeWo, enquanto rIFN- γ não é capaz de controlar a infecção por <i>T. gondii</i>	46

3.3. Tratamento com rTGF- β 1 e rIFN- γ regulam positivamente a expressão de ICAM-1 em células BeWo, independentemente da infecção por <i>T. gondii</i>	47
3.4. Associação entre células ICAM-1 $^{+}$ e índice de infecção por <i>T. gondii</i>	50
3.5. Tratamento com rTGF- β 1 e rIFN- γ induzem maior produção de TNF- α em células BeWo.....	51
3.6. A adesão de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HeLa é reduzida com a neutralização da molécula ICAM-1.....	52
4. DISCUSSÃO.....	54
FIGURAS.....	62
TABELAS.....	71
CAPÍTULO II.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
1.1. Sinalização intracelular ativada por IFN- γ	75
1.2. Sinalização intracelular ativada por IL-10.....	78
1.3. Sinalização intracelular ativada por TGF- β	79
2. JUSTIFICATIVA.....	82
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
3.1. Manutenção de células BeWo e HeLa em cultura.....	82
3.2. Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i> em cultura.....	82
3.3. Manutenção da cepa 2F1 de <i>T. gondii</i> em cultura.....	83
3.4. Infecção por <i>T. gondii</i> (cepa 2F1 ou RH) e tratamento com citocinas em células BeWo e HeLa.....	83
3.5. Ensaio de proliferação de <i>T. gondii</i> (cepa 2F1).....	84
3.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para IL-10, TGF- β 1 e MIF.....	85
3.7. Dosagem de citocinas do perfil Th1/Th2 e IL-17A por citometria de fluxo.....	86
3.8. Cinética da expressão de STAT-1, IRF-1, STAT-3, Smad2 e Smad3 em células BeWo e HeLa tratadas com rIFN- γ , rIL-10 ou rTGF- β 1.....	87
3.9. Western blotting para STAT-1, IRF-1, STAT-3, Smad2 e Smad3.....	88
3.10. Ensaio de viabilidade celular.....	89
3.11. Índice de proliferação de <i>T. gondii</i> (cepa 2F1) em células BeWo e HeLa tratadas com inibidores de STAT-1 e STAT-3.....	90

3.12. Análise estatística.....	91
4. RESULTADOS.....	91
4.1. A proliferação de <i>T. gondii</i> é aumentada em células BeWo tratadas com rIL-10 e rTGF- β 1, enquanto rIFN- γ não é capaz de controlar a proliferação do parasito.....	91
4.2. Produção diferenciada de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1) e pró-inflamatórias (MIF e IL-6) em células BeWo e HeLa.....	93
4.3. Células BeWo tratadas com rIFN- γ apresentam fosforilação reduzida de STAT-1 e baixa expressão de IRF-1.....	95
4.4. Em células BeWo, rIL-10 induz fosforilação de STAT-3, mas rTGF- β 1 não é capaz de induzir fosforilação de Smad2 e Smad3.....	97
4.5. A regulação da proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> induzida por rIFN- γ e rIL-10 é dependente de STAT-1 e STAT-3, respectivamente.....	97
5. DISCUSSÃO.....	99
FIGURAS.....	109
CONCLUSÕES GERAIS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
ANEXO.....	143

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório capaz de infectar uma diversidade de células, incluindo células trofoblásticas. Estudos prévios demonstraram que interleucina (IL)-10, fator transformador de crescimento (TGF)- β 1 e interferon (IFN)- γ são importantes citocinas envolvidas na susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e células epiteliais uterinas humanas (linhagem HeLa) à infecção por *T. gondii*. Adicionalmente, *T. gondii* é capaz de aderir à membrana plasmática de células hospedeiras através da molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1). O presente estudo investigou dois objetivos gerais: (i) verificar o papel de IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ na expressão de ICAM-1 em células BeWo e HeLa, bem como analisar a influência de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* a estas células quando tratadas ou não com as mesmas citocinas; e (ii) verificar os mecanismos intracelulares ativados por IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ em células BeWo e HeLa no intuito de compreender os efeitos diferenciais exercidos por essas citocinas nessas distintas linhagens celulares. Para executar o primeiro objetivo, células BeWo e HeLa foram infectadas por *T. gondii* (cepa RH) e tratadas com rIL-10, rTGF- β 1 ou rIFN- γ . As células foram analisadas quanto ao índice de infecção, expressão de ICAM-1, produção de fator de necrose tumoral (TNF)- α e quanto ao papel de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* às células na presença ou ausência de anticorpo neutralizante específico anti-ICAM-1. Para desenvolver o segundo objetivo, células BeWo e HeLa foram tratadas com rIL-10, rTGF- β 1 ou rIFN- γ , infectadas por *T. gondii* (cepa 2F1 ou RH) e analisadas quanto ao índice de proliferação intracelular do parasito, à produção de citocinas, à fosforilação dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT)-1, STAT-3 e Smad2/3, à expressão do fator regulador de interferon (IRF)-1, bem como o efeito da inibição destas vias intracelulares na proliferação de *T. gondii*. Nas células BeWo, rIL-10 e rTGF- β 1 induziram aumento do índice de infecção, mas apenas rTGF- β 1 e rIFN- γ promoveram aumento da expressão de ICAM-1, da produção de TNF- α , do número de células ICAM-1 $^{+}$ com parasitos aderidos à membrana e do número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1 $^{+}$. Por outro lado, rTGF- β 1 e rIFN- γ reduziram a expressão de ICAM-1 induzida por *T. gondii* em células HeLa, direcionando a uma menor susceptibilidade destas células à infecção. E, contrariamente ao observado para células HeLa, o índice de proliferação intracelular de *T. gondii* foi aumentado em células BeWo tratadas com rIL-10 e rTGF- β 1, enquanto que rIFN- γ foi incapaz de controlar este índice nestas células. A proliferação do parasito regulada por rIFN- γ e rIL-10 em células BeWo e HeLa esteve relacionada a maior fosforilação de STAT-1 e expressão de IRF-1 em

células HeLa e a fosforilação de STAT-3 em células BeWo. A influência dessas vias intracelulares na proliferação de *T. gondii* foi confirmada quando os inibidores de STAT-1 e STAT-3 foram usados, revertendo os mecanismos efetores de regulação do parasitismo induzidos por rIFN- γ e rIL-10. Quanto à produção de citocinas, células HeLa secretaram maiores concentrações de MIF se comparado às células BeWo, enquanto que células BeWo produziram maiores quantidades de IL-6 em comparação com células HeLa. Portanto, esses dados coletivamente demonstraram que IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ induziram susceptibilidades diferentes à infecção por *T. gondii* em células BeWo e HeLa ao modularem distintamente a expressão de ICAM-1 e as vias de sinalização intracelulares, contribuindo assim no entendimento de alguns dos mecanismos usados por *T. gondii* para se estabelecer em células trofoblásticas humanas e os possíveis efeitos intracelulares de algumas citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias responsáveis pela maior susceptibilidade de células trofoblásticas à infecção.

Palavras chaves: células trofoblásticas BeWo, células HeLa, *Toxoplasma gondii*, ICAM-1, TGF- β 1, IFN- γ , IL-10 e sinalização intracelular

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a parasite able to infect various cell types, including trophoblast cells. Studies demonstrated that interleukin (IL)-10, transforming growth factor (TGF)- β 1 and interferon (IFN)- γ are cytokines involved in the susceptibility of BeWo trophoblast cells and cervical uterine cells (HeLa lineage) to *T. gondii* infection. Furthermore, *T. gondii* is able to adhere to the plasma membrane of host cells through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). The present study investigated two major aims: (i) the role of IL-10, TGF- β 1 and IFN- γ in the expression of ICAM-1 in BeWo and HeLa cells and the adhesion of *T. gondii* to these cells under the influence of these cytokines; and (ii) the intracellular mechanisms triggered by IL-10, TGF- β 1 and IFN- γ in BeWo and HeLa cells in the differential susceptibility of these cells to infection. In order to perform the first aim, BeWo and HeLa cells were infected or not by *T. gondii* (RH strain) and treated or not with rIL-10, rTGF- β 1 or rIFN- γ . The cells were analyzed for the infection index, ICAM-1 expression, tumor necrosis factor (TNF)- α release, and for influence of ICAM-1 in the adhesion of the parasite to the host cells in the presence or absence of anti-ICAM-1 antibody. Additionally, to verify the second aim, BeWo and HeLa cells were treated or not with rIL-10, rTGF- β 1 or rIFN- γ , infected or not by *T. gondii* (2F1 or RH strain), and analyzed for *T. gondii* proliferation index, cytokines production, phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-1, STAT-3, Smad2/3 and interferon regulatory factor (IRF)-1 expression, as well as the effect of the inhibition of these intracellular pathways in the proliferation of *T. gondii*. For the BeWo cells, rIL-10 and rTGF- β 1 favored susceptibility to infection, but only rTGF- β 1 and rIFN- γ promoted an increase of ICAM-1 expression, TNF- α release, the number of ICAM-1 $^{+}$ cells with membrane-adhered parasites and the total number of membrane adhered-parasites in ICAM-1 $^{+}$ cells. On the other hand, rTGF- β 1 and rIFN- γ downregulated the expression of ICAM-1 triggered by *T. gondii* in HeLa cells, leading to control of the infection. In contrast to HeLa cells, *T. gondii* proliferation index was increased in BeWo cells treated with rIL-10 and rTGF- β 1, while rIFN- γ was unable to control it. The parasite proliferation regulated by rIFN- γ and rIL-10 in BeWo and HeLa cells was associated with the high phosphorylation of STAT-1 and IRF-1 expression in HeLa cells and the activation of STAT-3 in BeWo cells. The influence of these intracellular pathways in the parasite proliferation was confirmed when STAT-1 or STAT-3 inhibitors were used to revert the effectors mechanisms of the parasite regulation induced by rIFN- γ and rIL-10. In relation to cytokine production, HeLa cells produced higher concentrations of MIF if compared to BeWo cells, while BeWo cells

secreted higher concentrations of IL-6 when compared to HeLa cells. Taken together, these data conclude that IL-10, TGF- β 1 or IFN- γ cytokines regulate the susceptibility of BeWo and HeLa cells to *T. gondii* infection when differentially modulate ICAM-1 expression and trigger distinct intracellular pathways, contributing to the understanding of this particular strategy used by *T. gondii* to adhere and invade trophoblast cells and the intracellular effects of some cytokines responsible to the higher susceptibility of trophoblast cells to infection.

Keywords: BeWo trophoblast cells, HeLa cells, *Toxoplasma gondii*, ICAM-1, TGF- β 1, IFN- γ , IL-10 and intracellular pathways

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. *Toxoplasma gondii*: formas de infecção e ciclo de vida

T. gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa com habilidade para infectar uma diversidade de animais vertebrados, como aves e mamíferos (Remington et al., 2001). O parasito é o agente etiológico da toxoplasmose, infecção com elevada soroprevalência na população humana, atingindo aproximadamente metade da população mundial (Blader; Saeij, 2009).

Morfologicamente, *T. gondii* se assemelha às demais células eucarióticas. Há presença de um núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, lisossomos e retículo endoplasmático. O parasito possui uma forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana. Certas vezes, apresenta-se oval, indicando o início de um processo de divisão celular (Remington et al., 2001). Além de organelas típicas de organismos eucariontes, *T. gondii* apresenta ainda organelas especialmente envolvidas com os processos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira: micronemas, roptrias e grânulos densos (Blader; Saeij, 2009).

T. gondii apresenta três estágios infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (Montoya; Liesenfeld, 2004). Os taquizoítas são freqüentemente encontrados no estágio agudo da infecção, onde se observa uma alta capacidade de multiplicação do parasito, principalmente em tecidos muscular, ocular, nervoso e placenta dos hospedeiros intermediários (Montoya; Liesenfeld, 2004). Os bradizoítas são as formas típicas encontradas na fase crônica da infecção e se localizam dentro de cistos, os quais se formam em resposta ao sistema imune dos hospedeiros. Os cistos teciduais são comumente encontrados no cérebro e tecidos musculares destes hospedeiros (Montoya; Liesenfeld, 2004). Os esporozoítas são encontrados apenas nos hospedeiros definitivos, representados pelos felinos domésticos e

selvagens. Estes esporozoítas estão localizados no interior de oocistos que, ao serem liberados juntamente com as fezes no meio ambiente, sofrem esporulação tornando-se altamente resistentes e infectantes (Tenter; Heckeroth; Weiss, 2000). As principais vias de aquisição da infecção se dão através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais repletos de bradizoítas no seu interior; ingestão de água, frutas e verduras contaminadas por oocistos; através da via transplacentária; transfusão sanguínea; transplante de órgãos e até mesmo por acidentes laboratoriais (Blader; Saeij, 2009; Montoya; Liesenfeld, 2004; Silva; Langoni, 2009).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxênico, sendo hospedeiros definitivos os gêneros *Felis* e *Lynx*, nos quais o parasito desenvolve um ciclo de vida sexuado, enquanto que em hospedeiros intermediários, comumente aves e mamíferos incluindo a espécie humana, o parasito desenvolve o ciclo assexuado (Silva; Langoni, 2009). Felinos podem ser infectados com qualquer uma das fases evolutivas de *T. gondii*, no entanto a seqüência de eventos melhor conhecida é aquela que se desenvolve após a ingestão de cistos teciduais. Assim, após a ingestão desses cistos teciduais, enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal dissolvem a parede destes cistos, liberando centenas de bradizoítas que invadem células epiteliais do intestino delgado. Neste local, o parasito se replica por um processo denominado esquizogonia, resultando em esquizontes. Os núcleos dos esquizontes iniciam lentamente a sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos. Estes, por sua vez, originam os gametas masculino e feminino e a fertilização ocorre no epitélio intestinal do hospedeiro, levando à formação dos oocistos. Juntamente com as fezes, os oocistos são liberados para o ambiente onde sofrem esporulação, resultando em oito esporozoítas no interior de cada oocisto (Dubey; Lindsay; Speer, 1998). Uma vez que os hospedeiros intermediários ingerem estes oocistos accidentalmente, os parasitos convertem para o estágio de taquizoítas, sendo capazes de invadir qualquer célula do organismo. Caso a

ingestão seja de cistos teciduais, estes também serão convertidos em taquizoítas nos hospedeiros intermediários (Montoya; Liesenfeld, 2004).

A toxoplasmose é uma infecção que geralmente cursa de modo assintomático ou subclínico na maioria dos indivíduos infectados (Filisetti; Candolfi, 2004). No entanto, manifestações graves da infecção podem ser observadas em indivíduos imunocomprometidos e em crianças ou recém-nascidos infectados congenitamente, caracterizando um importante problema de saúde pública (Pinard et al., 2003).

Nos indivíduos imunocomprometidos, representados pelos portadores de HIV, pessoas que fazem uso de drogas imunossupressoras ou que apresentam deficiências no seu sistema imunológico, a forma grave da toxoplasmose normalmente surge como a reativação de uma infecção latente, quando bradizoítas no interior de cistos teciduais retornam ao seu estágio de taquizoítas (Miller et al.; 2009). O sistema nervoso central é o local de manifestações mais graves nesses indivíduos, levando a um quadro de encefalite aguda (Porter; Sande, 1992). Por outro lado, os recém-nascidos infectados congenitamente podem apresentar um quadro agudo subclínico ou benigno ao nascimento e durante a infância. No entanto, na puberdade ou idade adulta, esses indivíduos podem apresentar quadros de retinocoroidite resultantes de uma infecção não diagnosticada precocemente. Além disso, esses recém-nascidos podem ser sintomáticos, apresentando sinais clínicos graves como calcificações intracranianas, hidrocefalia, microcefalia, retinocoroidite, epilepsia, retardamento mental e até cegueira (Jones et al., 2001; Piper; Wen, 1999).

1.2. Mecanismos de adesão e invasão da célula hospedeira

A adesão de *T. gondii* à célula hospedeira é inicialmente mediada por proteínas de superfície do parasito, denominadas comumente de antígenos de superfície (SAGs) (Pollard et al., 2008). Existem inúmeras proteínas de membrana da célula hospedeira usadas como

receptores para as SAGs, como a heparina (Carruthers et al., 2000) e a molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1) (Barragan; Brossier; Sibley, 2005). Após esse primeiro contato do parasito com a célula hospedeira, o parasito aumenta seus níveis intracelulares de cálcio por mecanismos ainda não totalmente conhecidos, o que permite ativar várias quinases dependentes de cálcio que, por sua vez, induzem a secreção de proteínas derivadas das micronemas (Blader; Saeij, 2009; Nagamune; Sibley, 2006; Zhou et al., 2005). Atualmente se conhece 20 tipos de proteínas secretadas pelas micronemas (Blader; Saeij, 2009; Zhou et al., 2005), sendo a proteína de micronema tipo 2 (MIC-2) a mais bem estudada até o momento. MIC-2 é uma proteína aderente transmembrânica, cujo domínio extracelular contém integrinas capazes de se ligarem a moléculas de glicosaminoglicanas, como heparan sulfato, da célula hospedeira (Sibley, 2004; Wan et al., 1997). Além disso, MIC-2 está associada a outra proteína denominada proteína acessória de MIC-2 (M2AP). O complexo formado MIC-2/M2AP é liberado na superfície de *T. gondii* e logo se liga aos receptores das células hospedeiras. Portanto, pode-se afirmar que o complexo MIC-2/M2AP participa diretamente da adesão de *T. gondii* nas células do hospedeiro (Carruthers, 2002; Sibley, 2004). Barragan e colaboradores (2005) demonstraram que a MIC-2 de *T. gondii* se liga à ICAM-1 da célula hospedeira, permitindo ao parasito migrar até os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta, utilizando-se de uma via paracelular. Esse tipo de deslocamento parasitário permite a invasão de novos tecidos e, consequentemente, a disseminação mais rápida do parasito no organismo hospedeiro (Barragan; Brossier; Sibley, 2005).

Logo após a adesão de *T. gondii* na célula hospedeira, o parasito inicia um movimento específico e dependente de actina e miosina denominado “*gliding*” que, possivelmente, é fundamental para a entrada do parasito na célula (Blader; Saeij, 2009). Posteriormente, ocorre a liberação de proteínas derivadas das roptrias (ROPs), onde várias subunidades de ROP-2,

ROP-4, ROP-5 e ROP-8 associam-se para formar um complexo capaz de transportar o parasito para o interior da célula hospedeira (Straub et al., 2009). Dziadek e colaboradores (2007) demonstraram um novo atributo das roptrias, ao relatar que ROP-2 e ROP-4 ligam-se a lactoferrina humana, como um fenômeno capaz de influenciar no processo de adesão do parasito à célula hospedeira e posterior replicação intracelular.

Os grânulos densos são organelas que descarregam seu conteúdo protéico dentro do vacúolo parasitóforo após a invasão do parasito. As proteínas dos grânulos densos (GRA-1 a GRA-9) possuem diferentes pesos moleculares e permanecem solúveis no lúmen do vacúolo parasitóforo ou associadas a ele, garantindo uma fonte de nutrição e impedindo a ligação de lisossomos ao vacúolo (Carruthers, 2002). Estudos revelaram que *T. gondii* usa GRA-7 para redirecionar o transporte de nutrientes da célula hospedeira em direção ao lúmen do vacúolo parasitóforo (Coppens et al., 2006). Este processo se dá pelo redirecionamento dos microtúbulos e filamentos intermediários da célula hospedeira, garantindo que as organelas do hospedeiro concentrem-se nos arredores do vacúolo parasitóforo (Blader; Saeij, 2009; Coppens et al., 2006).

1.3. Resposta imune a *T. gondii* e mecanismos de evasão do parasito

O controle da infecção é o resultado de mecanismos imunológicos complexos e a imunidade celular é considerada componente chave na resposta imune do hospedeiro devido ao controle da replicação do parasito (Filisetti; Candolfi, 2004; Lindberg; Frenkel, 1977; Schlüter et al., 1991).

A imunidade mediada por células é caracterizada pela presença de macrófagos, linfócitos T, células “natural killers” (NK) e leucócitos polimorfonucleares, que são funcionalmente ativos em hospedeiros imunocompetentes (Denkers; Gazzinelli, 1998; Lang et al., 2007). A resposta imune inicial ou inata envolve a participação de macrófagos, células

dendríticas e células NK, além de outras células de natureza não hematopoiética (Hauser; Sharma; Remington, 1983).

Os receptores de reconhecimento padrão (TLRs) TLR-2 e TLR-4 de macrófagos são capazes de reconhecer as proteínas de superfície do parasito ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Debierre-Grockiego et al., 2007). Esta ligação induz a uma via de sinalização intracelular nos macrófagos dependentes da molécula adaptadora MyD88 (Denkers, 2010). Neste sentido, camundongos nocautes para MyD88 são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*, uma vez que apresentam alta taxa de mortalidade como consequência de replicação e disseminação não controladas do parasito (Sukhumavasi et al., 2008). A ativação de MyD88 direciona à produção de fator de necrose tumoral (TNF)- α e à maior expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) classe II nos macrófagos (Debierre-Grockiego et al., 2009).

A presença de MHC-II nos macrófagos e células dendríticas torna estas células apresentadoras de抗ígenos (APCs). Além disso, essas células também secretam citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-12 e TNF- α , que ativam linfócitos T CD4 $^{+}$ a produzirem interferon (IFN)- γ (Denkers, 2010; Gazzinelli et al., 1994; Hunter et al., 1995; John; Weninger; Hunter, 2010). A ativação de macrófagos por IFN- γ induz suas atividades microbicidas que incluem mecanismos oxidativos, não oxidativos e indução da enzima degradante de triptofano: indoleamina 2,3 dioxygenase (IDO) (Ding; Nathan; Stuehr, 1988; Heseler et al., 2008; Hughes, 1988; Lang et al., 2007; Pfefferkon; Rebhun; Eckel, 1986). IL-12 também é secretada por neutrófilos após infecção por *T. gondii*, o que garante o estabelecimento de uma imunidade tipicamente pró-inflamatória ou Th1 (Gazzinelli et al., 1994; John; Weninger; Hunter, 2010; Silva; Langoni, 2009). Células NK também secretam IFN- γ e parecem agir em sinergismo com os macrófagos na imunidade inata (Hunter et al., 1994).

Uma vez estabelecida a resposta imune mediada pelas células da imunidade inata e o conseqüente processamento antigênico no interior das APCs, os linfócitos tornam-se ativados e diferenciam-se na subpopulação Th1, que é predominante no curso da infecção por *T. gondii* (Silva; Langoni, 2009). Estudos recentes demonstraram que linfócitos TCD4⁺ conseguem reconhecer抗ígenos de *T. gondii* por intermédio de Nod2, receptor de reconhecimento padrão localizado intracelularmente, demonstrando que os linfócitos são células que também podem reconhecer抗ígenos, como o fazem as APCs profissionais (Shaw et al., 2009).

Citocinas como IFN- γ e IL-2 são potencialmente inflamatórias e secretadas por linfócitos TCD4⁺ (Silva; Langoni, 2009). IFN- γ possui inúmeras atividades biológicas, dentre elas a ativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos como já descrito, a promoção da citotoxicidade de linfócitos TCD8⁺, o aumento da expressão de moléculas MHC-II (McCabe; Luft; Remington, 1984), a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, a prevenção da ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reativação do parasito no hospedeiro (Bohne; Heesemann; Gross, 1993; Skariah; McIntyre; Mordue, 2010). Neste contexto, pesquisas realizadas em modelo experimental murino demonstraram que a produção de IFN- γ por células T é essencial para prevenção da reativação da infecção por *T. gondii* (Denkers et al., 1997; Wang et al., 2004). Adicionalmente, algumas enzimas induzidas por IFN- γ da família de guanosídeo trifosfato (GTPases) também mostraram atividades contra a infecção por *T. gondii*, pois estas enzimas tendem a se acumular nas proximidades do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a sua destruição (Butcher et al., 2005; Collazo et al., 2001; Zhao et al., 2009). Por outro lado, IL-2 atua no recrutamento de novos linfócitos TCD4⁺ e promove a ativação de células TCD8⁺ ou células citotóxicas, que produzem enzimas proteolíticas – granzimas e perforinas, capazes de romper a membrana de parasitos livres ou células infectadas pelo mesmo (Subauste; Koniaris; Remington, 1991).

Além de IFN- γ , IL-12, IL-2 e TNF- α , *T. gondii* também induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-17A (Passos et al., 2010). Durante infecção por *T. gondii*, as células NK demonstraram serem responsáveis pela maior produção de IL-17A em camundongos C57 RAG^{-/-} e esta produção foi influenciada por TGF- β , IL-23 e principalmente por IL-6 (Passos et al., 2010). A sinalização intracelular mediada por IL-17 exerce um papel protetor no hospedeiro contra infecção por *T. gondii*, uma vez que camundongos nocautes para o receptor específico de IL-17 apresentaram alta taxa de mortalidade devido ao não controle da replicação do parasito no intestino delgado (Kelly et al., 2005). Adicionalmente, IL-17 parece ser importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (Kelly et al., 2005).

Apesar de *T. gondii* induzir à produção de citocinas pró-inflamatórias no hospedeiro, *T. gondii* também é capaz de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- β (Gazzinelli et al., 1996). IL-10 tem o papel de regular a produção de IFN- γ e a proliferação de linfócitos T, antagonizando os efeitos pró-inflamatórios desencadeados pela resposta imune Th1 e prevenindo uma resposta imune exacerbada prejudicial ao próprio hospedeiro (Lang et al., 2007). Além de IL-10, TGF- β também exerce função imunomoduladora, uma vez que induz à redução da produção de IFN- γ por células NK e à desativação de macrófagos (Lang et al., 2007).

Portanto, de um modo geral, a resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii* é tipicamente celular e pró-inflamatória, caracterizada pela alta produção de citocinas inflamatórias que ativam células fundamentais no controle da infecção. No entanto, *T. gondii* apresenta inúmeros mecanismos capazes de regular a resposta imune do hospedeiro, no intuito de evadir a esta resposta e manter-se viável nas células hospedeiras (Denkers, 2003).

Durante infecção por *T. gondii*, macrófagos retardam a produção de IL-12 por cerca de 24 horas quando estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) (Denkers, 2003). O parasito

também é capaz de inibir a fosforilação de p65/RelA, proteína que participa da cascata de sinalização envolvida na habilidade de translocação do fator de transcrição nuclear (NF)-κB para o núcleo. Frente a esta situação, os macrófagos e células dendríticas diminuem a produção de IL-12 e TNF- α em resposta aos抗ígenos parasitários (Shapira et al., 2005).

A infecção de macrófagos murinos, da linhagem RAW 264.7, por parasitos viáveis de *T. gondii* resultou na inibição da fosforilação do fator de transcrição ativado por IFN- γ STAT-1, da secreção de óxido nítrico e da expressão de genes da família das GTPases, reconhecidas como prejudiciais à sobrevivência parasitária. Essas interferências mediadas pelo parasito na resposta imune dos macrófagos foram consequências da ativação de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS), principalmente SOCS-1 (Zimmermann et al., 2006). Butcher e colaboradores (2005) demonstraram que a infecção de macrófagos murinos pelo parasito induziu a fosforilação de STAT-3, fator de transcrição ativado por IL-10, envolvido na regulação de genes supressores de citocinas pró-inflamatórias. *T. gondii* também inibiu a produção de óxido nítrico e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em micróglia murina ativada por IFN- γ e este efeito foi dependente da regulação de TGF- β 1 pelo parasito (Rozenfeld et al., 2005).

Finalmente, *T. gondii* também é capaz de induzir a expressão de lipoxina A₄ (LXA₄), eicosanóide que exerce função imunomoduladora da expressão de IL-12 em células dendríticas murinas (Aliberti et al., 2002). A produção de LXA₄ é dependente da enzima 5-lipoxygenase (LO) e camundongos deficientes para esta enzima, quando infectados por parasitos viáveis, não produzem LXA₄ e, consequentemente, as células dendríticas desses animais continuam a produzir IL-12 e a controlar a infecção (Aliberti et al., 2002).

Assim, a relação parasito-hospedeiro é um balanço delicado de ações e reações mútuas, quando hospedeiro controla a replicação do parasito ao montar uma resposta imune adequada, mas não exacerbada a ponto de prejudicar o próprio hospedeiro. E o parasito, além

de se beneficiar da não ocorrência da resposta imune exacerbada no hospedeiro, é capaz de modular e evadir desta resposta para sua sobrevivência nas células hospedeiras.

1.4. *T. gondii* na interface materno-fetal

Como já discutido anteriormente, *T. gondii* provoca no organismo hospedeiro uma resposta imune tipicamente pró-inflamatória (Lang et al., 2007) e a toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da infecção (Jones et al., 2001). Frente a estes dois parâmetros, é de extremo interesse compreender a interação do parasito na interface materno-fetal, já que neste microambiente deve existir uma tolerância imunológica entre tecidos fetais e maternos que impeça a rejeição do feto por uma resposta imune materna fortemente pró-inflamatória.

O trofoblasto é uma célula de origem fetal que possui uma diversidade de funções que propiciam o sucesso gestacional. Primeiramente, esta célula é responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio receptivo, pela nutrição do embrião e por formar a porção fetal da placenta (Fitzgerald et al., 2008). Além dessas habilidades, o trofoblasto é uma célula essencial na produção de citocinas e outros mediadores biológicos que mantém o equilíbrio gestacional (Challis et al., 2009; Luppi, 2003).

Existem três fases imunológicas distintas no curso da gestação (Koga et al., 2009). No início da gestação, há um perfil preferencialmente pró-inflamatório, com alta produção de fatores inflamatórios como IL-8 e proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) (Naruse et al., 2010). A invasão do trofoblasto no endométrio uterino durante a implantação gera a síntese de citocinas pró-inflamatórias, essenciais na montagem de reações inflamatórias necessárias à ruptura do epitélio uterino pelo trofoblasto, bem como às modificações das artérias espiraladas que garantem a nutrição do embrião em desenvolvimento (Koga et al., 2009). Os principais leucócitos encontrados na interface materno-fetal durante o primeiro trimestre gestacional são as células NK uterinas, importantes para a invasão do trofoblasto no

endométrio e para a angiogênese, e macrófagos que fagocitam células em apoptose e debris celulares (Hanna et al., 2006; Mor et al., 2005). No período médio da gestação se estabelece uma fase de tolerância ideal entre organismo materno e fetal, gerando um perfil preferencialmente anti-inflamatório. Já o fim gestacional é marcado por infiltração de células imunológicas para a interface materno-fetal, criando um meio inflamatório necessário para o parto (Koga et al., 2009).

Existe uma estreita cooperação entre placenta e sistema imune materno (Koga et al., 2009). As células trofoblásticas humanas expressam todos os 10 tipos existentes de TLRs. No primeiro trimestre de gestação, TLR-2 e TLR-4 estão situados exclusivamente no citotrofoblasto e trofoblasto extraviloso; enquanto que estes receptores tornam-se presentes no sinciciotrofoblasto apenas no terceiro trimestre (Beijar et al., 2006; Rindsjo et al., 2007). A expressão de TLRs nestas camadas diferentes de trofoblasto torna estas células componentes do sistema imune inato, já que é capaz de responder a estímulos com LPS, peptidioglicanas e a vírus (Holmlund et al., 2002; Koga et al., 2009). Os fatores inflamatórios liberados pelas células trofoblásticas após ativação de TLRs exercem uma função imunomoduladora nas células imunes maternas, diminuindo as ações inflamatórias de monócitos e macrófagos (Fest et al., 2007). Neste contexto, células trofoblásticas humanas de primeiro trimestre (linhagem Sw.71) foram capazes de reduzir a secreção de fatores inflamatórios (IL-8 e TNF- α) por monócitos humanos da linhagem THP-1 após estímulo com LPS (Fest et al., 2007). Portanto, é possível especular que reações inflamatórias são necessárias para o sucesso gestacional, porém o trofoblasto é capaz de modular (“educar”) as células imunes maternas para impedir reações inflamatórias exacerbadas ou não desejadas potencialmente prejudiciais à gestação.

Uma vez que a gestação é marcada por uma tolerância do sistema imunológico materno em relação aos抗ígenos fetais, qualquer desequilíbrio deste delicado balanço imunológico pode resultar em problemas na gestação ou até abortos recorrentes (Luppi, 2003;

Raghupathy, 2001; Tangri; Raghupathy, 1993). O estabelecimento de um desequilíbrio imunológico pode ser consequência de vários fatores, por exemplo, a presença de patógenos como *T. gondii* na interface materno-fetal, já que este parasito induz a uma resposta tipicamente pró-inflamatória.

Para melhor compreender o papel do trofoblasto na imunologia da gestação e, especialmente, na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando-se de linhagens celulares pré-estabelecidas, como as células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo), isoladas em 1968 e que mantém muitas características típicas de trofoblasto (Pattilo; Gey, 1968). Nossos estudos prévios demonstraram que células BeWo foram altamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* na presença de IL-10 e TGF-β1 (Barbosa et al., 2008). Adicionalmente, IFN-γ, citocina pró-inflamatória que deveria controlar a disseminação do parasito, foi incapaz de controlar ambas invasão e replicação de *T. gondii* em células BeWo (Barbosa et al., 2008; Oliveira et al., 2006), embora o tratamento destas células com IFN-γ tenha controlado a replicação de *Neospora caninum*, parasito altamente semelhante a *T. gondii* (Carvalho et al., 2010). Frente à infecção por *T. gondii*, supõe-se que células trofoblásticas, mesmo sob estímulo pró-inflamatório oferecido por IFN-γ, são capazes de modular o perfil imunológico na interface materno-fetal para garantir a manutenção da gestação, mesmo que favoreça infecção fetal por patógenos intracelulares.

Células trofoblásticas de vilos coriônicos humanos obtidos de placenta de primeiro trimestre gestacional aumentaram a produção do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) quando tratados com antígeno solúvel de *T. gondii* (Ferro et al., 2008). Esta elevada produção de MIF propiciou elevada expressão da molécula ICAM-1 no sinciciotrofoblasto, resultando em maior adesão de monócitos a estas células placentárias, representando uma possível via facilitadora da transmissão do parasito para tecidos fetais (Ferro et al., 2008). Isto

se justifica porque a disseminação de *T. gondii* pelo organismo hospedeiro ocorre predominantemente por meio de monócitos (Channon; Kasper, 1996; Dunay; Sibley, 2010). Recentemente, nossos estudos prévios demonstraram que células trofoblásticas humanas obtidas de placenta a termo mostraram-se mais suscetíveis a infecção por *T. gondii* que células trofoblásticas de primeiro trimestre gestacional (Gomes et al., 2011). Sugerimos que este evento possa estar relacionado ao potente efeito de MIF no primeiro trimestre de gestação, que tende a controlar o parasitismo (Gomes et al., 2011).

Adicionalmente, placenta com vilite ou intervilosite causadas por infecções provocadas por *T. gondii* ou *Trypanosoma cruzi* atraíram uma diversidade de células imunológicas para a barreira placentária, causando a ruptura desta barreira e propiciando a migração dessas células e do próprio parasito para o interior da placenta (Juliano; Blotta; Altermani, 2006). Estes eventos relacionaram-se com a alta expressão de ICAM-1 pelo sinciciotrofoblasto (Juliano; Blotta; Altermani, 2006). Outros estudos demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-1 β propiciaram maior expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas BeWo e, simultaneamente, favoreceram a adesão de monócitos THP-1 infectados por *T. gondii*, mais uma vez evidenciando uma via facilitadora da disseminação do parasito para tecidos placentários (Pfaff et al., 2005).

Assim, infecções por *T. gondii* na interface materno-fetal podem desencadear desequilíbrio neste microambiente, favorecendo a infecção de tecidos fetais. De acordo com nossos estudos prévios (Barbosa et al., 2008; Ferro et al., 2008; Oliveira et al., 2006), este fenômeno parece ser influenciado por ICAM-1 e pela presença de citocinas como IL-10, TGF- β 1, IFN- γ e MIF. Assim, novos estudos se fazem necessários para verificar o papel desses mediadores imunológicos na interface materno-fetal na presença de *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA

A passagem transplacentária de *T. gondii* é um processo complexo que envolve a participação de diversas proteínas, citocinas e moléculas de adesão. Conhecer os mecanismos que propiciam a passagem de *T. gondii* pela interface materno-fetal tem o potencial de gerar informações fundamentais para o estabelecimento de estratégias efetivas no combate à infecção dos tecidos placentários e fetais. Assim, o presente trabalho se propôs a investigar alguns dos mecanismos usados por *T. gondii*, especialmente ICAM-1, para se estabelecer em células trofoblásticas humanas e os possíveis efeitos intracelulares de algumas citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1) e pró-inflamatórias (IFN- γ) na susceptibilidade destas células à infecção. Para uma maior facilidade de compreensão, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- **Capítulo I:** Investigar o papel de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ na expressão de ICAM-1 e na adesão de *T. gondii* às células BeWo e HeLa
- **Capítulo II:** Investigar o papel das vias de sinalização intracelulares ativadas por IL-10, TGF-β1 e IFN-γ em células BeWo e HeLa e a produção de citocinas potencialmente envolvidas com susceptibilidade das células a *T. gondii*

3.2. Objetivos Específicos

Capítulo I:

- Verificar o efeito de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ no índice de infecção de *T. gondii* em células BeWo e HeLa
- Verificar o efeito de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ na expressão de ICAM-1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii*
- Verificar associação entre expressão de ICAM-1 e infecção por *T. gondii*
- Verificar a participação de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* em células BeWo e HeLa tratadas nas condições que regularam alta expressão de ICAM-1

Capítulo II:

- Verificar o efeito de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HeLa
- Verificar a produção de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii*

- Verificar a produção de citocinas do perfil Th1 (IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ e MIF), Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17A) em células BeWo e HeLa pré-tratadas com citocinas e infectadas ou não por *T. gondii*
- Verificar a ativação/fosforilação de STAT-1, STAT-3 e Smad2/3 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas ou não com IFN- γ , IL-10 ou TGF- β 1, respectivamente
- Verificar a expressão de IRF-1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas ou não com IFN- γ
- Verificar o efeito das vias de STAT-1 e STAT-3 na proliferação intracelular *T. gondii* em células BeWo e HeLa tratadas com inibidores de STAT-1 (Fludarabine) ou de STAT-3 (WP1066)

Células HeLa (células epiteliais do cérvix uterino humano) foram usadas como parâmetro de comparação em todos os experimentos realizados, uma vez que a resposta destas células epiteliais a infecção por *T. gondii* difere consideravelmente das células BeWo, como já demonstrado por nós em estudos anteriores (Barbosa et al., 2008; Oliveira et al., 2006).

CAPÍTULO I

Papel das citocinas IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ na expressão de ICAM-1 e na adesão de *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (BeWo) e células epiteliais uterinas humanas (HeLa)

1. INTRODUÇÃO

ICAM-1 é uma proteína transmembrânica pertencente à família das imunoglobulinas e encontrada em vários tipos celulares como leucócitos e células endoteliais (Lawson; Wolf, 2009). ICAM-1 realiza importantes funções nas respostas imunes inata e adaptativa, pois esta molécula está envolvida na migração transendotelial de leucócitos para os sítios de inflamação, assim como em interações entre APCs e os linfócitos T (Lawson; Wolf, 2009).

A expressão de ICAM-1 é ampla, ou seja, além de sua presença em células endoteliais e leucócitos, diversos estudos apontam a expressão de ICAM-1 em células da interface materno-fetal. Estudos demonstraram que a expressão de ICAM-1 ocorre principalmente no sinciciotrofoblasto, estroma e em algumas células endoteliais fetais de tecidos placentários humanos de primeiro trimestre gestacional (Ferro et al., 2008), bem como em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto de tecidos placentários humanos a termo (Gaffuri et al., 1998). ICAM-1 é importante na interface materno-fetal, especialmente durante o primeiro trimestre gestacional, uma vez que auxilia nos processos de adesão, invasão e migração do trofoblasto no endométrio, promovendo angiogênese e desenvolvimento placentário (Gearing; Newman, 1993; Hu et al., 2010). No entanto, ICAM-1 torna-se exacerbadamente expresso em tecidos placentários derivados de gestantes com pre-eclâmpsia, as quais apresentam vasos sanguíneos com várias células inflamatórias aderidas, como macrófagos e linfócitos T (Labarrere et al., 1995).

Muitos estudos já relacionaram a influência de patógenos na expressão de ICAM-1, seja na interface materno-fetal ou sistemicamente. Maubert e colaboradores (1997) verificaram alta expressão de ICAM-1 em sinciciotrofoblasto de placenta a termo infectadas por *Plasmodium falciparum*, especialmente quanto tratadas com TNF- α . Monócitos e macrófagos de placenta infectadas por *P. falciparum* promoveram o recrutamento de

eritrócitos infectados para o espaço intervilosso através de ICAM-1 (Bulmer et al., 1993; Ismail et al., 2000; Ordi et al., 1998). Placentas com inflamações como vilite ou intervilosite provocadas por *T. cruzi* ou *T. gondii* demonstraram influxo de macrófagos, linfócitos e granulócitos para dentro da placenta, já que a expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto proporcionou a adesão dessas células de defesa e, simultaneamente, favoreceu a infecção desses tecidos (Juliano; Blotta; Altermani, 2006). Ferro e colaboradores (2008) demonstraram aumento da expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto de primeiro trimestre gestacional após estímulo com antígeno solúvel de *T. gondii*. Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , produzidas por células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) infectadas por *T. gondii*, aumentaram a expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas BeWo, propiciando uma maior adesão de monócitos (THP-1) a estas células trofoblásticas (Pfaff et al., 2005). Barragan e colaboradores (2005) demonstraram que *T. gondii* aderiu-se a ICAM-1 expresso em células BeWo através de sua proteína de micronema MIC-2. Portanto, é possível que *T. gondii* faça uso de ICAM-1 para migrar até sítios imunologicamente privilegiados, como o microambiente placentário (Barragan; Brossier; Sibley, 2005).

Algumas citocinas pró-inflamatórias já demonstraram influenciar significativamente na expressão de ICAM-1. IFN- γ , TNF- α e IL-1 proporcionaram maior expressão de ICAM-1 em células BeWo (Pfaff et al., 2005) e em fibroblastos de pulmão humano (Spoelstra et al., 1999). Um efeito sinergístico de IFN- γ , TNF- α e IL-17 na expressão de ICAM-1 foi observado em células de disco intervertebral humano (Gabr et al., 2011) e, adicionalmente, TNF- α favoreceu a expressão de ICAM-1 em trofoblasto humano derivado de placenta com pré-eclâmpsia, sendo este efeito dependente da ativação de NF- κ B (Abe et al., 2008).

Nossos estudos prévios demonstraram que as citocinas IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ modularam diferentemente a susceptibilidade de células trofoblásticas humanas BeWo e células epiteliais uterinas humanas (HeLa) à infecção por *T. gondii* (Barbosa et al., 2008). Se

ICAM-1 é uma proteína regulada por patógenos como *T. gondii* na interface materno-fetal (Ferro et al., 2008; Juliano; Blotta; Altermani, 2006) e pode representar uma molécula adicional de adesão para *T. gondii* (Barragan; Brossier; Sibley, 2005), é plausível supor que ICAM-1 esteja envolvida na transmissão de *T. gondii* para tecidos fetais humanos. Assim, estudos que investiguem a função de ICAM-1 na passagem transplacentária de *T. gondii* podem esclarecer alguns dos mecanismos de transmissão do parasito para o feto. Neste sentido, nós investigamos o papel de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ na expressão de ICAM-1 em células BeWo e HeLa, bem como o efeito de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* a estas células na presença das mesmas citocinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção de células BeWo e HeLa em cultura

Células de coriocarcinoma humano (linhagem **BeWo**) e células epiteliais do cérvix uterino humano (linhagem **HeLa**) foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), 10.000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, de acordo com Barbosa e colaboradores (2008).

O repique das células foi realizado a cada dois dias e procedeu-se, brevemente, da seguinte maneira: primeiramente, as células foram lavadas com meio sem soro e em seguida incubadas com solução de tripsina mais 0,25% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)

(Sigma) durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Depois, as células foram lavadas e retiradas dos frascos de cultura com uso de meio a 10% de soro, transferidas para tubos falcon de 15ml e centrifugadas a 400g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1ml de meio com soro e distribuídas em frascos novos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento: 90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma).

2.2. Manutenção *in vivo* e *in vitro* da cepa RH de *T. gondii*

Primeiramente, a cepa RH de *T. gondii* foi mantida *in vivo* na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (Mineo et al., 1980). O repique foi realizado a cada 48 horas e procedeu-se da seguinte maneira: a cavidade peritoneal de camundongos infectados foi lavada com meio de cultura RPMI 1640 sem soro e o exsudato peritoneal contendo taquizoítas foi inoculado em camundongos não infectados para manutenção da cepa *in vivo*.

Os taquizoítas retirados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss foram centrifugados a 400g por 5 minutos, contados em câmara de Newbauer e adicionados em frascos de cultura contendo monocamada de células BeWo e HeLa com a finalidade de manter parasitos *in vitro* para os futuros procedimentos experimentais. À medida que a grande maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres foi centrifugado a 400g por 5 minutos, os parasitos homogeneizados em meio a 2% de soro e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

2.3. Infecção de células BeWo e HeLa por *T. gondii* e tratamento com citocinas

Numa primeira etapa de experimentos, células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos,

homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 5×10^4 células a cada 200 μ l de meio. Posteriormente, as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13 mm (BioSan, Belo Horizonte, MG, Brasil) dentro de placas de 24 poços (Caltech, Uberlândia, MG, Brasil) em meio RPMI a 10% de soro e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas, as células foram infectadas por taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, numa proporção de 5 parasitos por célula (5:1), em meio a 2% de soro e incubadas durante 3 horas em estufa. Em seguida, os parasitos não aderentes foram removidos por lavagem dos poços com meio a 2% de soro e as células infectadas permaneceram em estufa por adicionais 24 horas. Como controle, as células não foram infectadas por *T. gondii*. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Numa segunda etapa de experimentos, células BeWo e HeLa foram cultivadas sobre lamínulas redondas de 13mm (5×10^4 células/200 μ l) dentro de placas de 24 poços em meio a 10% de soro, durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram pré-tratadas com as formas recombinantes de TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), IL-10 (R&D Systems), ambas numa concentração de 50ng/ml, ou IFN- γ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a 20ng/ml, de acordo com Barbosa e colaboradores (2008). Após 24 horas em estufa, as células foram infectadas ou não por *T. gondii* (5:1), incubadas durante 3 horas, os parasitos não aderentes removidos por lavagem dos poços com meio a 2% de soro, e as células novamente tratadas com rTGF- β 1, rIL-10 ou rIFN- γ nas mesmas concentrações em meio a 2% de soro por adicionais 24 horas. Paralelamente, células BeWo e HeLa foram tratadas com as citocinas, mas não infectadas; ou foram apenas infectadas e não tratadas com citocinas. Como controle, as células não foram tratadas com citocinas e nem infectadas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Numa terceira etapa de experimentos, células HeLa foram cultivadas sobre lamínulas redondas de 13mm (5×10^4 células/200 μ l) dentro de placas de 24 poços em meio a 10% de

soro, durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com meio condicionado (sobrenadante de células HeLa previamente infectadas) por 24 horas. Como controle, células HeLa não foram tratadas com meio condicionado ou foram apenas infectadas por *T. gondii* (5:1) em meio a 2% de soro por adicionais 24 horas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As células provenientes das 3 etapas de experimentos foram lavadas em salina tamponada com Tris a 20mM (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) (TBS, pH 7,4), fixadas em formol a 10% em TBS por 24 horas e submetidas a imuno-histoquímica para detecção de ICAM-1.

2.4. Imuno-histoquímica para ICAM-1

A imuno-histoquímica para ICAM-1 foi realizada de acordo com Ferro e colaboradores (2008), com pequenas modificações. Brevemente, as lamínulas contendo células aderidas foram lavadas com TBS, incubadas com 5% de ácido acético durante 8 minutos a temperatura ambiente para bloqueio da fosfatase alcalina endógena, tratadas com 5% de soro normal de coelho por 45 minutos a 37°C para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos e incubadas por 12 horas a 4°C com anticorpo primário policlonal de cabra anti-ICAM-1 humano (R&D Systems) na concentração de 1:300. Posteriormente, as células foram lavadas com TBS, incubadas com anticorpo secundário de coelho anti-cabra biotinilado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) na concentração de 1:3000 durante 1 hora a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas novamente em TBS e incubadas com o complexo ABC (complexo avidina-biotina) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:100 por 40 minutos a 37°C para amplificação do sinal da reação. Então, as células foram lavadas em TBS, a reação foi revelada com fast red naphthol (Sigma) por aproximadamente 8 minutos, as células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris

e observadas ao microscópio de luz para análise de 4 parâmetros diferentes: (1) porcentagem (%) de células infectadas a cada 200 células examinadas aleatoriamente (índice de infecção); (2) porcentagem de células positivas para ICAM-1 (células ICAM-1⁺) a cada 400 células examinadas aleatoriamente; (3) número de células ICAM-1⁺ a cada 100 células infectadas por *T. gondii*; e (4) número de células ICAM-1⁻ a cada 100 células infectadas por *T. gondii*.

2.5. Western blotting para ICAM-1

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 1×10^5 células a cada 1ml de meio. Posteriormente, as células foram adicionadas diretamente em placas de 24 poços e cultivadas em meio RPMI a 10% de soro em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes rTGF-β1, rIL-10 (ambas a 50ng/ml) ou rIFN-γ (20ng/ml) em meio a 10% de soro por mais 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas por *T. gondii* (5:1) em meio a 2% de soro e, após 3 horas de incubação, parasitos não aderentes foram removidos por lavagem dos poços e as células foram novamente tratadas com as citocinas nas mesmas concentrações em meio a 2% de soro por adicionais 24 horas. Paralelamente, células BeWo e HeLa foram tratadas com as citocinas, mas não infectadas; ou foram apenas infectadas e não tratadas com citocinas. Como controle, as células não foram tratadas com citocinas e nem infectadas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C para posterior dosagem de TNF-α.

As células foram coletadas, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas e lisadas em tampão de lise contendo 50mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM de EDTA; 0,5% de Triton X100; 10% de glicerol; 1mM de dithiothreitol (DTT), 200mM de NaCl e suplementado

com coquetel de inibidores de proteases (Complete®, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha) mais 1mM de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) e 1mM de fluoreto de sódio (NaF) (ambos Sigma). Os lisados foram centrifugados a 13.000g por 15 minutos a 4°C, os sobrenadantes contendo proteínas totais foram coletados e submetidos à dosagem protéica pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Após o ajuste para 30 μ g de proteínas, as amostras de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) sobre condições desnaturantes (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de PVDF (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas contendo as proteínas totais foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação constante em tampão de blotting (25mM de Tris; 0,15M de NaCl e 0,1% de Tween 20, pH 7,4) contendo 4% de leite em pó (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil). Após este período, as membranas foram incubadas por 12 horas a temperatura ambiente e sob agitação com anticorpo primário policlonal de cabra anti-ICAM-1 humano (R&D Systems) ou anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), ambos na concentração de 1:1000, diluídos em tampão de blotting com 2% de leite em pó. Depois, as membranas foram lavadas em tampão de blotting e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (anti-cabra-peroxidase ou anti-camundongo-peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories) na concentração de 1:3000 em tampão de blotting também a 2% de leite em pó durante 2 horas sob agitação e temperatura ambiente. A reação foi revelada em câmara escura usando kit de quimioluminescência (ECL kit, GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil) e as quantidades iguais de proteínas foram confirmadas por coloração de Pounceau (1%). A densitometria foi realizada usando o programa “KODAK software” (1D Image Analysis Software 3.5) com a finalidade de determinar a intensidade média das bandas. Os dados foram demonstrados como densidade relativa da razão entre as intensidades médias das bandas de ICAM-1 e β -actina.

2.6. Reação em cadeia de polimerase quantitativa (PCR em tempo real) para ICAM-1

Células BeWo e HeLa foram cultivadas, tratadas e infectadas sob as mesmas condições experimentais descritas no item 2.5. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. As células foram coletadas, centrifugadas a 400g por 5 minutos e o RNA total foi isolado usando reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 20 μ l usando “ImProm-II Reverse Transcriptase” (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e contendo 4 μ g de RNA total, 20pmol de oligo dT primer (Invitrogen Life Technologies), 40U de RNAsin, 1M de dNTP mix e 1U de tampão de transcriptase reversa. O cDNA foi tratado com 10 μ g de RNase (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) antes que a amplificação fosse realizada usando o detector de seqüência ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A expressão relativa do gene para ICAM-1 humano foi analisada baseada no método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizada pela expressão do gene para β -actina humana como controle endógeno. Todas as reações foram realizadas com “SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystems), usando um volume de 20 μ l em cada reação contendo 2 μ l de cDNA, 5pmol de cada primer e 10 μ l de “SYBR Green”. Os primers usados para amplificação foram os seguintes: para ICAM-1 humano, 5'- CAAGGCCTCAGTCAGTGTGA -3' (*forward*) and 5'- CCTCTGGCTTCGTCAAGAAC -3' (*reverse*), e para β -actina humana, 5'- AAGGATTCCATGTGGCGA -3' (*forward*) and 5'- TCCATGTCGTCCCAGTTGGT -3' (*reverse*).

2.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para TNF- α

As concentrações de TNF- α nos sobrenadantes de células BeWo e HeLa foram quantificadas nas condições que regularam positivamente ou negativamente a expressão de

ICAM-1 por ELISA Captura, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (BD Biosciences) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-TNF- α humano na diluição de 1:250 em 0,1M de carbonato de sódio por 12 horas a 4°C; em seguida as placas foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 10% de soro diluído em PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens em PBS-T, 50 μ l da curva (500pg/ml a 3,9pg/ml em PBS a 10% de soro) ou 50 μ l das amostras de sobrenadantes de células BeWo e HeLa foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção anti-TNF- α humano biotinilado (1:500) mais estreptavidina conjugada com peroxidase diluídos em PBS a 10% de soro durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com 3,3,5,5 tetramethylbenzidine (TMB) (Zymed, San Francisco, CA, EUA) mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram demonstrados em pg/ml de acordo com a referência da curva padrão. O limite de detecção do ensaio foi de 3.9pg/ml.

2.8. Influência de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* em células BeWo e HeLa

Com o objetivo de verificar a influência de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* em células BeWo e HeLa estimuladas ou não com citocinas ou meio condicionado, as células foram tratadas nas condições que promoveram alta expressão de ICAM-1 e experimentos de adesão na presença de *T. gondii* foram realizados.

Nesse propósito, células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas em meio a

10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 2×10^4 células a cada 200 μ l de meio. Posteriormente, as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13 mm dentro de placas de 24 poços em meio RPMI a 10% de soro e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, células BeWo foram tratadas com rTGF-β1 (50ng/ml) ou rIFN-γ (20ng/ml), enquanto que células HeLa foram tratadas com meio condicionado (sobrenadante de células HeLa infectadas) por mais 24 horas. Depois, as células foram fixadas com paraformoldeído 4% diluído em PBS por 30 minutos, lavadas duas vezes com meio a 10% de soro, incubadas com *T. gondii* (5:1) durante 3 horas para permitir adesão, mas não invasão, dos parasitos às células, e novamente fixadas com paraformoldeído 4% por adicionais 24 horas, de acordo com Oliveira e colaboradores (2006). Como controle, células BeWo e HeLa não foram tratadas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Para confirmar o papel de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* às células BeWo e HeLa, experimentos foram conduzidos em paralelo na presença de anticorpo neutralizante anti-ICAM-1 humano no intuito de neutralizar a molécula expressa na membrana das células e verificar a adesão dos parasitos. Para isso, as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13 mm dentro de placas de 24 poços (2×10^4 células/200 μ l) em meio RPMI a 10% de soro e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, células BeWo foram tratadas com rTGF-β1 (50ng/ml) ou rIFN-γ (20ng/ml), enquanto que células HeLa foram tratadas com meio condicionado por mais 24 horas. Antes da fixação com paraformoldeído 4%, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo monoclonal neutralizante anti-ICAM-1 humano (Millipore, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 10 μ g/ml ou isótipo controle (Roche Diagnostics) em estufa a 37°C e 5% de CO₂, de acordo com estudos prévios (Barragan; Brossier; Sibley, 2005; Pfaff et al., 2005). Após fixação por 30 minutos, as células foram incubadas com *T. gondii* (5:1) por 3 horas para permitir a adesão do parasito às células,

lavadas em meio a 10% de soro, e novamente fixadas com paraformoldeído 4% por adicionais 24 horas (Oliveira et. al., 2006). Como controle, células BeWo e HeLa não foram tratadas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As células fixadas foram lavadas em TBS e submetidas a imuno-histoquímica para detecção de ICAM-1. As lâminas foram observadas em microscópio de luz e os seguintes parâmetros foram determinados: (1) porcentagem de células ICAM-1⁺ a cada 200 células examinadas aleatoriamente; (2) número de células ICAM-1⁺ a cada 100 células com parasitos aderidos à membrana; (3) número de células ICAM-1⁻ a cada 100 células com parasitos aderidos à membrana; (4) número total de parasitos aderidos à membrana a cada 100 células ICAM-1⁺; e (5) número total de parasitos aderidos à membrana a cada 100 células ICAM-1⁻.

Depois, a porcentagem de inibição do número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana, bem como a porcentagem de inibição do número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺, foram calculadas quando a molécula ICAM-1 foi neutralizada com anticorpo específico. As taxas de inibição (%) foram calculadas subtraindo os valores obtidos (médias) das células não tratadas com anti-ICAM-1 daqueles valores obtidos (médias) de células tratadas com anti-ICAM-1, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{média sem anticorpo neutralizante}) - (\text{média com anticorpo neutralizante})}{\text{média sem anticorpo neutralizante}} \times 100$$

2.9. Análise estatística

Todos os dados foram analisados como média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e as comparações entre condições pares foram realizadas pelo teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prism versão 4.0

(GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Células BeWo apresentam maior expressão de ICAM-1, independentemente da infecção por *T. gondii*

Células BeWo e HeLa apresentaram índices de infecção similares, demonstrando um percentual de células infectadas em torno de 49,6% e 47%, respectivamente (Figura 1A). Quanto à expressão de ICAM-1 na ausência de *T. gondii*, um maior percentual de células ICAM-1⁺ foi detectada na linhagem BeWo (38,1%) em comparação com células HeLa (24,2%) ($P<0,01$) (Figura 1B). A infecção por *T. gondii* não foi capaz de alterar a expressão de ICAM-1 em células BeWo (39,7%) em relação às células não infectadas (38,1%) (Figura 1B). No entanto, células HeLa infectadas por *T. gondii* aumentaram significativamente a expressão de ICAM-1, uma vez que o percentual de células ICAM-1⁺ alcançou uma média de 40,9% quando comparado às células não infectadas (24,2%) ($P<0,01$) (Figura 1B).

Para confirmar os resultados de expressão de ICAM-1 quantificados por imuno-histoquímica, células BeWo e HeLa foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ diretamente em placas de 24 poços, infectadas ou não por *T. gondii* (5:1) por 24 horas e lisadas para extração de proteínas totais para detecção de ICAM-1 por Western blotting. Os resultados obtidos no Western blotting confirmaram os dados observados na imuno-histoquímica, quando células BeWo apresentaram maior expressão de ICAM-1 em relação às células HeLa ($P<0,05$), independentemente de infecção por *T. gondii* (Figura 1C-D). No entanto, a infecção por *T. gondii* aumentou consideravelmente a expressão de ICAM-1 em

células HeLa quando comparado às mesmas células na ausência do parasito ($P<0,01$) (Figura 1C-D).

3.2. Tratamento com rTGF- β 1 e rIL-10 induzem aumento do índice de infecção em células BeWo, enquanto rIFN- γ não é capaz de controlar a infecção por *T. gondii*

No intuito de verificar a influência de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1) e pró-inflamatórias (IFN- γ) no índice de infecção em células BeWo e HeLa, estas células foram cultivadas sobre lamínulas redondas de 13 mm dentro de placas de 24 poços, pré-tratadas com as formas recombinantes de TGF- β 1, IL-10 ou IFN- γ , infectadas ou não por *T. gondii* (5:1) e novamente tratadas com as mesmas citocinas. Finalmente, as células foram fixadas, processadas para imuno-histoquímica para detecção de ICAM-1 e analisadas quanto ao índice de infecção.

O índice de infecção aumentou significativamente em células BeWo tratadas com rIL-10 (70,2%) ou rTGF- β 1 (74,1%) quando comparado às células infectadas e não tratadas (49,6%) ($P<0,01$) (Figura 2A). No entanto, rIFN- γ não foi capaz de controlar o índice de infecção em células BeWo (53%) em relação às células infectadas e não tratadas (49,6%), apresentando uma tendência em aumentar o percentual de células infectadas (Figura 2A).

Por outro lado, o índice de infecção foi maior em células HeLa apenas na presença de rIL-10 (69,5%) quando comparado às células infectadas e não tratadas (47%) ($P<0,01$) (Figura 2B). Diferentemente de células BeWo, rIFN- γ foi capaz de controlar o índice de infecção em células HeLa (24,8%) em comparação às células infectadas e não tratadas (47%) ($P<0,01$) (Figura 2B).

A expressão de ICAM-1 em células BeWo e HeLa tratadas com rIL-10, rTGF- β 1 ou rIFN- γ também foi analisada e será descrita no próximo item.

3.3. Tratamento com rTGF- β 1 e rIFN- γ regulam positivamente a expressão de ICAM-1 em células BeWo, independentemente da infecção por *T. gondii*

Com o objetivo de verificar a influência das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1) e pró-inflamatórias (IFN- γ) na expressão de ICAM-1 em células BeWo e HeLa, estas células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ sobre lamínulas redondas de 13 mm dentro de placas de 24 poços, pré-tratadas com rTGF- β 1, rIL-10 ou rIFN- γ , infectadas ou não por *T. gondii* (5:1) e novamente tratadas com as mesmas citocinas. Finalmente, as células foram fixadas, processadas para imuno-histoquímica para detecção da proteína ICAM-1 e analisadas quanto à porcentagem de células ICAM-1⁺.

Como já descrito anteriormente, a infecção por *T. gondii* não foi capaz de aumentar o percentual de células ICAM-1⁺ na linhagem BeWo em relação às células não infectadas e não tratadas (39,7% e 38,1%, respectivamente) (Figura 3A). rIL-10 também não foi capaz de promover um aumento no percentual de células ICAM-1⁺ na linhagem BeWo (34,6%) em relação às células não tratadas (38,1%) (Figura 3A). No entanto, ambas citocinas rTGF- β 1 e rIFN- γ foram capazes de regular positivamente a expressão de ICAM-1 em células BeWo infectadas ou não por *T. gondii* (Figura 3A). O percentual de células ICAM-1⁺ alcançou médias de 49,3% e 43% em células BeWo não infectadas e tratadas com rTGF- β 1 e rIFN- γ , respectivamente, em relação às células não infectadas e não tratadas (38,1%,) ($P<0,001$ e $P<0,05$). E, na presença de *T. gondii*, o percentual de células ICAM-1⁺ alcançou médias de 45,6% e 45,2% em células BeWo tratadas com rTGF- β 1 e rIFN- γ , respectivamente, quando comparado às células não tratadas (38,1%,) ($P<0,01$) (Figura 3A). Fotomicrografias representativas de células BeWo infectadas e não tratadas (Figura 3C), infectadas e tratadas com rTGF- β 1 (Figura 3D) e infectadas e tratadas com rIFN- γ (Figura 3E) demonstraram estas diferenças, uma vez que maior marcação para ICAM-1 foi observada na membrana

plasmática de células BeWo tratadas com rTGF- β 1 ou rIFN- γ em comparação com as células não tratadas e infectadas.

Com relação às células HeLa, a infecção por *T. gondii* induziu a um significante aumento na porcentagem de células ICAM-1⁺ (40,9%) em relação às células não infectadas e não tratadas (24,2%) ($P<0,01$) (Figura 3B). Apenas rIFN- γ , na ausência de *T. gondii*, foi capaz de regular positivamente a expressão de ICAM-1 em células HeLa, uma vez que proporcionou um aumento no percentual de células ICAM-1⁺ (38,2%) quando comparado às células não infectadas e não tratadas (24,2%) ($P<0,05$) (Figura 3B). Diferentemente de células BeWo, rTGF- β 1 não induziu maior expressão de ICAM-1 em células HeLa (29,2%) em comparação às células não tratadas e não infectadas (24,2%) (Figura 3B). Interessantemente, rTGF- β 1 e rIFN- γ reduziram significativamente a maior expressão de ICAM-1 ativada por *T. gondii* em células HeLa, pois diminuíram o percentual de células ICAM-1⁺ (20,2% e 21,4%) para níveis similares ao controle (24,2%) quando comparado às células infectadas e não tratadas (40,9%) ($P<0,01$) (Figura 3B). Fotomicrografias representativas de células HeLa infectadas e não tratadas (Figura 3F), infectadas e tratadas com rTGF- β 1 (Figura 3G) e infectadas e tratadas com rIFN- γ (Figura 3H) demonstraram estas diferenças, uma vez que maior marcação para ICAM-1 foi observada na membrana plasmática de células HeLa infectadas e não tratadas, enquanto uma redução considerável desta marcação pode ser detectada nas células tratadas com rTGF- β 1 ou rIFN- γ e infectadas por *T. gondii*.

A infecção por *T. gondii* foi capaz de regular positivamente a expressão de ICAM-1 apenas em células HeLa (Figura 3B). Com o objetivo de comparar a presença viável do parasito e a influência de mediadores inflamatórios induzidos por *T. gondii* na expressão de ICAM-1 em células HeLa, estas células foram tratadas com sobrenadante de células HeLa previamente infectadas por *T. gondii* (meio condicionado). Os resultados obtidos mostraram

que mediadores inflamatórios presentes no meio condicionado foram capazes de aumentar o percentual de células ICAM-1⁺ (29,5%) em comparação com células HeLa não tratadas e não infectadas (14,6%) ($P<0,05$) (Figura 3I). No entanto, a presença de parasitos viáveis induziu maior porcentagem de células HeLa ICAM-1⁺ (41,7%) em relação ao meio condicionado (29,5%) ($P<0,05$) (Figura 3I).

Para confirmar os resultados de expressão da proteína ICAM-1 quantificados por imuno-histoquímica, células BeWo e HeLa foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ dentro de placas de 24 poços, pré-tratadas com rTGF-β1, rIL-10 ou rIFN-γ, infectadas ou não por *T. gondii* (5:1) e novamente tratadas com as mesmas citocinas. Finalmente, as células foram lisadas para extração de proteínas totais para detecção de ICAM-1 por Western blotting. Células BeWo aumentaram significativamente a expressão de ICAM-1 quando tratadas com rTGF-β1 ou rIFN-γ, independentemente da presença de infecção por *T. gondii*, em comparação com células não tratadas ($P<0,01$ e $P<0,05$) (Figura 4A-B). Diferentemente, maior expressão de ICAM-1 foi detectada em células HeLa infectadas e não tratadas ($P<0,05$) ou tratadas apenas com rIFN-γ ($P<0,01$) em relação às células não tratadas e não infectadas (Figura 4D-E). Interessantemente, a alta expressão de ICAM-1 em células HeLa induzida por *T. gondii* foi reduzida significativamente quando estas células foram tratadas com rTGF-β1 ou rIFN-γ (ambos $P<0,05$) em comparação com células HeLa infectadas e não tratadas (Figura 4D-E).

No intuito de também verificar a expressão de RNAm para ICAM-1 em células BeWo e HeLa, os mesmos tratamentos com as citocinas na presença ou ausência de *T. gondii* foram realizados. Semelhante aos resultados para a proteína ICAM-1, houve maior expressão de RNAm para ICAM-1 em células BeWo tratadas com rTGF-β1 ($P < 0,05$) ou rIFN-γ ($P<0,001$ e $P<0,01$), independentemente da presença de *T. gondii*, em comparação com células não tratadas, embora rIFN-γ tenha aparentemente induzido maior expressão de RNAm para

ICAM-1 do que rTGF- β 1 (Figura 4C). rIFN- γ induziu maior expressão de RNAm para ICAM-1 em células HeLa não infectadas ($P<0,01$) (Figura 4F). Apesar de *T. gondii* ter induzido maior expressão da proteína ICAM-1 em células HeLa não tratadas, não foi detectada maior expressão de RNAm para ICAM-1 em células HeLa infectadas e não tratadas (Figura 4F).

3.4. Associação entre células ICAM-1⁺ e índice de infecção por *T. gondii*

Após determinar índice de infecção por *T. gondii* e expressão de ICAM-1 influenciados pelas citocinas rIL-10, rTGF- β 1 ou rIFN- γ em células BeWo e HeLa, foi possível estabelecer uma associação entre os fatores envolvidos. Para células BeWo, foi verificado que rIFN- γ e rTGF- β 1 induziram ao aumento da porcentagem de células ICAM-1⁺ e, ao mesmo tempo, favoreceram maior invasão de *T. gondii* nestas células (Figura 5A). Entretanto, rTGF- β 1 e rIFN- γ induziram a uma diminuição na porcentagem de células HeLa ICAM-1⁺ infectadas e, ao mesmo tempo, favoreceram uma menor taxa de invasão de *T. gondii* nesta linhagem celular (Figura 5B). Apesar de rIL-10 favorecer aumento do índice de infecção em células BeWo e HeLa, esta citocina não promoveu aumento concomitante da expressão de ICAM-1 nestas células, portanto não se estabeleceu uma associação entre índice de infecção e expressão de ICAM-1 em células tratadas com rIL-10 (Figura 5A-B).

Evidente associação foi confirmada quando o número de células ICAM-1⁺ ou ICAM-1⁻ foi determinado em 100 células BeWo e HeLa infectadas por *T. gondii*. Quando células BeWo foram tratadas com rTGF- β 1 ou rIFN- γ , o número de células ICAM-1⁺ infectadas por *T. gondii* alcançou uma média de 85% ($P<0,01$) e 81,3% ($P<0,05$), respectivamente, quando comparado às células ICAM-1⁺ infectadas e não tratadas (64,5%) (Figura 5C). Além disso, o número de células BeWo ICAM-1⁺ infectadas foi consideravelmente maior em relação às células BeWo ICAM-1⁻ infectadas ($P<0,001$) (Figura 5C), mostrando a localização

preferencial de parasitos dentro de células BeWo ICAM-1⁺. Por outro lado, quando células HeLa foram tratadas com rTGF-β1 ou rIFN-γ, o número de células ICAM-1⁺ infectadas por *T. gondii* reduziu ao mostrar médias de 33,1% e 33,6% (ambos $P<0,001$), respectivamente, se comparado às células ICAM-1⁺ infectadas e não tratadas (70,1%) (Figura 5D). Quando células HeLa infectadas apresentaram menor expressão de ICAM-1 na presença de rTGF-β1 ou rIFN-γ, os parasitos se localizaram preferencialmente em células HeLa ICAM-1⁻ (Figura 5D).

3.5. Tratamento com rTGF-β1 e rIFN-γ induzem maior produção de TNF-α em células BeWo

No intuito de verificar se a expressão de ICAM-1 induzida por *T. gondii* e/ou citocinas em células BeWo e HeLa é dependente de TNF-α, estas células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ dentro de placas de 24 poços, pré-tratadas com rTGF-β1, rIL-10 ou rIFN-γ, infectadas ou não por *T. gondii* (5:1) e novamente tratadas com as mesmas citocinas. O sobrenadante foi coletado e submetido a ELISA para dosagem de TNF-α.

Nossos resultados demonstraram que *T. gondii* não induziu liberação de TNF-α em células BeWo, porém rTGF-β1 e rIFN-γ favoreceram maior produção de TNF-α em células BeWo infectadas ou não por *T. gondii* em comparação com células BeWo não tratadas ($P<0,05$ e $P<0,001$, respectivamente) (Figura 6A). Similar aos dados de expressão de RNA para ICAM-1, rIFN-γ induziu maior liberação de TNF-α em células BeWo quando comparado ao estímulo com rTGF-β1 ($P<0,01$ e $P<0,001$) (Figura 6A).

Com relação às células HeLa, *T. gondii* e rIFN-γ induziram maior produção de TNF-α se comparado às células não tratadas e não infectadas ($P<0,001$) (Figura 6B). No entanto, rTGF-β1 induziu redução na liberação de TNF-α em células HeLa infectadas ou não por *T. gondii* em relação às células não tratadas e não infectadas ou somente infectadas ($P<0,001$)

(Figura 6B). Além disso, em células HeLa infectadas e estimuladas com rIFN- γ , a produção de TNF- α caiu significativamente quando comparado às células somente infectadas ($P<0,001$) (Figura 6B).

3.6. A adesão de *T. gondii* em células BeWo e HeLa é reduzida com a neutralização da molécula ICAM-1

Para verificar a influência de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* à membrana plasmática de células BeWo e HeLa, ambas as células foram tratadas nas condições que regularam alta expressão de ICAM-1 e o número de parasitos aderidos à membrana das células foi determinado na presença ou ausência de neutralização da molécula ICAM-1. Numa primeira etapa de experimentos, células BeWo foram cultivadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços, tratadas com rTGF- β 1 ou rIFN- γ , fixadas com paraformoldeído 4%, lavadas com meio a 10% de soro, incubadas com *T. gondii* (5:1) durante 3 horas, novamente fixadas com paraformoldeído 4% e processadas para imuno-histoquímica para detecção de ICAM-1. Por outro lado, o mesmo experimento com células HeLa foi conduzido, porém estas células foram estimuladas apenas com meio condicionado. Numa segunda etapa de experimentos, células BeWo e HeLa foram incubadas por 1 hora com anticorpo neutralizante anti-ICAM-1 ou isotipo controle antes da interação com os parasitos. Após imuno-histoquímica, o número de células ICAM-1 $^+$ ou ICAM-1 $^-$ com parasitos aderidos à membrana, bem como o número total de parasitos aderidos a membrana em células ICAM-1 $^+$ ou ICAM-1 $^-$, foram determinados a cada 100 células examinadas. Além disso, a porcentagem de inibição na adesão de *T. gondii* às células BeWo e HeLa foi determinada após tratamento com anti-ICAM-1.

Quando células BeWo foram tratadas com rTGF- β 1 ou rIFN- γ , o número de células ICAM-1 $^+$ com parasitos aderidos à membrana, bem como o número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1 $^+$, foram significativamente maiores em comparação

com células ICAM-1⁺ não tratadas ($P<0,001$) e células ICAM-1⁻ ($P<0,001$) (Figura 7A-B). Entretanto, quando as células BeWo foram incubadas com anticorpo neutralizante anti-ICAM-1, o número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana, bem como o número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺, foram significativamente menores quando comparado às células ICAM-1⁺ não tratadas com anti-ICAM-1 ($P<0,001$) (Figura 7A-B). O tratamento de células BeWo com o isotipo controle não alterou a adesão de *T. gondii* em qualquer condição experimental realizada (Figura 7A-B). Fotomicrografias representativas de células BeWo não tratadas com citocinas (Figura 7C), não tratadas com citocinas e incubadas com anti-ICAM-1 (Figura 7D), tratadas com rTGF-β1 (Figura 7E), tratadas com rTGF-β1 e incubadas com anti-ICAM-1 (Figura 7F), tratadas com rIFN-γ (Figura 7G) e tratadas com rIFN-γ e incubadas com anti-ICAM-1 (Figura 7H) ilustraram estas diferenças, já que menor número de parasitos puderam ser observados em células ICAM-1⁺ incubadas com anticorpo neutralizante anti-ICAM-1.

Células HeLa tratadas com meio condicionado apresentaram número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana, bem como número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺, significativamente maiores em comparação com células ICAM-1⁺ não tratadas ($P<0,001$) e com células ICAM-1⁻ ($P<0,001$) (Figura 8A-B). De maneira semelhante ao observado em células BeWo, células HeLa foram incubadas com anticorpo neutralizante anti-ICAM-1 apresentaram número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana, bem como número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺, significativamente menores quando comparado às células ICAM-1⁺ não tratadas com anti-ICAM-1 ($P<0,001$) (Figura 8A-B). O tratamento de células HeLa com o isotipo controle também não alterou a adesão de *T. gondii* em qualquer condição experimental realizada (Figura 8A-B). Fotomicrografias representativas de células HeLa não tratadas com citocinas (Figura 8C), não tratadas com citocinas e incubadas com anti-ICAM-1 (Figura 8D),

tratadas com meio condicionado (Figura 8E), e tratadas com meio condicionado e incubadas com anti-ICAM-1 (Figura 8F) ilustraram estas diferenças, já que menor número de parasitos puderam ser observados em células ICAM-1⁺ incubadas com anticorpo neutralizante anti-ICAM-1.

Todos os dados até aqui apresentados estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2. Nas células BeWo, a neutralização da molécula ICAM-1 proporcionou um percentual de inibição no número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana e no número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺ de 57% e 60% para células não tratadas, respectivamente, e de 67% e 74% para células tratadas com rTGF-β1 ou rIFN-γ, respectivamente (Tabela 1). Já em células HeLa, a neutralização da molécula ICAM-1 proporcionou um percentual de inibição no número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana e no número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺ de 45% e 46% para células não tratadas, respectivamente, e de 62% e 65% para células estimuladas com meio condicionado respectivamente (Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

No primeiro capítulo deste estudo, foi investigado o papel de IL-10, TGF-β1 e IFN-γ na expressão de ICAM-1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii*, uma vez que este parasito faz uso de ICAM-1 para aderir-se nas células do hospedeiro (Barragan; Brossier; Sibley, 2005).

Primeiramente, foi observado que células BeWo e HeLa apresentaram similares índices de infecção por *T. gondii*, entretanto, na ausência de infecção, células BeWo apresentaram maior expressão de ICAM-1 quando comparado às células HeLa. E, na presença de *T. gondii*, apenas células HeLa foram capazes de aumentar a expressão de ICAM-1 em

relação às células não infectadas. Nossa hipótese é que *T. gondii*, quando em contato com células HeLa pela primeira vez, possa induzir a liberação de mediadores inflamatórios ou citocinas que seriam responsáveis por aumentar a expressão de ICAM-1 nestas células. Dessa forma, parasitos extracelulares derivados de células HeLa previamente infectadas e lisadas pela multiplicação de *T. gondii* poderiam agora aderir e invadir em novas células HeLa vizinhas com alta expressão de ICAM-1 na membrana. Esta hipótese foi confirmada quando tratamos células HeLa com sobrenadante de células previamente infectadas (meio condicionado), onde observou-se maior expressão de ICAM-1 quando comparado às células não tratadas, embora a presença do parasito viável tenha promovido maior expressão de ICAM-1 em relação ao meio condicionado. Assim, pode-se afirmar que o próprio parasito, além das citocinas induzidas pela sua presença, também participa diretamente da regulação de ICAM-1 em células HeLa.

Além de ICAM-1, outras moléculas da célula hospedeira também podem permitir a adesão e a invasão de *T. gondii*. Já foi demonstrado que eritrócitos infectados por *P. falciparum* foram capazes de migrar para o sistema nervoso central através da ligação com várias moléculas do hospedeiro como trombospondinas (Roberts et al., 1985), glicosaminoglicanas sulfatadas como condroitin sulfato (Rogerson et al., 1995) e integrina $\alpha v\beta 3$ (Siano et al., 1998). Adicionalmente, *P. falciparum* também foi capaz de invadir células do sistema nervoso central por intermédio de ICAM-1 (Dietrich, 2002; Turner et al., 1994).

Embora *T. gondii* não tenha induzido maior expressão de ICAM-1 em células BeWo no presente estudo, alguns estudos verificaram a capacidade deste parasito em regular a expressão de ICAM-1 em outros modelos experimentais. O estímulo de vilos placentários humanos de primeiro trimestre gestacional com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) induziu aumento na expressão de ICAM-1, especialmente na camada de sinciciotrofoblasto (Ferro et al., 2008). Alta expressão de ICAM-1 foi encontrada no sinciciotrofoblasto de placenta

humanas diagnosticadas com vilite ou intervilosite causadas por *T. gondii* ou *T. cruzi* (Juliano; Blotta; Altermani, 2006). As divergências de resultados podem ser explicadas pelos diferentes desenhos experimentais utilizados no presente estudo em comparação com os outros dois acima descritos. Similarmente a *T. gondii*, alguns estudos demonstraram que *P. falciparum* modulou positivamente a expressão de ICAM-1. Placentas a termo infectadas por *P. falciparum* apresentaram alta expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto, principalmente quando tratadas com TNF- α (Maubert et al., 1997). Monócitos e macrófagos pertencentes a placenta infectadas por *P. falciparum* expressaram altos níveis de ICAM-1, favorecendo a adesão destas células aos eritrócitos do espaço interviloso (Bulmer et al., 1993; Ordi et al., 1998; Ismail et al., 2000). No entanto, de acordo com os nossos resultados, Sugiyama e colaboradores (2001) não detectaram alta expressão de ICAM-1 induzida por *P. falciparum* no sinciciotrofoblasto ou citotrofoblasto de placenta a termo humanas infectadas por este protozoário.

Adicionalmente, diversos estudos revelaram que *T. gondii* e *P. falciparum* foram capazes de regular positivamente a expressão de ICAM-1 em outros tipos celulares não derivados do microambiente placentário. *T. gondii* induziu ao aumento de ICAM-1 em células epiteliais pigmentares da retina humana (Nagineni et al., 2000), em células endoteliais de cérebro murino (Lachenmaier et al., 2011) e humano (Hughes et al., 2010), em células endoteliais da veia umbilical bovina (Taubert et al., 2006), em tecidos cerebrais de camundongos C57BL/6 e BALB/c (Silva et al., 2010) e em monócitos humanos (Unno et al., 2010). Surpreendentemente, apenas parasitos viáveis foram capazes de induzir ao aumento da expressão de ICAM-1 em monócitos humanos, excluindo a interferência de mediadores inflamatórios na indução desta molécula de adesão (Unno et al., 2010), diferentemente do observado por nós, quando meio condicionado proporcionou aumento significante na expressão de ICAM-1 em células HeLa. Portanto, é plausível especular que a expressão de

ICAM-1 pode ser ativada por diferentes estímulos (parasitos viáveis ou mediadores inflamatórios) em diferentes populações celulares.

Posteriormente, nós demonstramos que o índice de infecção de *T. gondii* foi aumentado em células BeWo tratadas com IL-10 ou TGF-β1, como já anteriormente demonstrado por nosso grupo (Barbosa et al., 2008). Embora tenhamos previamente demonstrado que IFN-γ promoveu maior invasão e replicação intracelular de *T. gondii* em células BeWo (Barbosa et al., 2008), o presente estudo mostrou que IFN-γ não alterou o índice de infecção nestas células. Esta divergência provavelmente esteja relacionada com a menor concentração de IFN-γ usada no presente estudo (20ng/ml), que foi dez vezes menor que a concentração utilizada anteriormente (200ng/mL, Barbosa et al., 2008). Por outro lado, IFN-γ reduziu o índice de infecção em células HeLa, enquanto o tratamento com TGF-β1 não alterou este índice nestas células, como também já demonstrado anteriormente (Barbosa et al., 2008). É possível então afirmar que essas citocinas (TGF-β1 e IFN-γ) agem diferentemente em células BeWo e HeLa, regulando a susceptibilidade à infecção por *T. gondii*.

De acordo com nossas observações, outros estudos já demonstraram reduzido efeito de IFN-γ em células trofoblásticas humanas. IFN-γ foi incapaz de estimular a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO) em células BeWo (Entrican et al., 2002), um importante mecanismo anti-parasitário ativado por IFN-γ em muitos tipos celulares, incluindo células HeLa (Carvalho et al., 2010). Além do mais, IFN-γ não foi capaz de induzir a fosforilação de STAT-1 em células trofoblásticas humanas da linhagem Jar e JEG-3, impedindo a regulação de genes dependentes de IFN-γ (Choi et al., 2007). O efeito oposto foi observado em células HeLa, uma vez que apresentaram forte ativação de STAT-1 e alta regulação de genes ativados por IFN-γ (Choi et al., 2007). Assim, células trofoblásticas parecem resistir aos efeitos pró-inflamatórios de IFN-γ, provavelmente um mecanismo altamente necessário para a manutenção do desenvolvimento embrionário, impedindo sua

rejeição pelo organismo materno (Challis et al., 2009; Saito, 2000), mesmo que favoreça a infecção de tecidos placentários (Oliveira et al., 2006; Barbosa et al., 2008).

Células BeWo, independentemente de infecção, aumentaram a expressão de ICAM-1 quando tratadas com TGF- β 1 ou IFN- γ . Nas células HeLa, a maior expressão de ICAM-1 foi dependente de parasitos viáveis ou meio condicionado e, interessantemente, a elevada expressão de ICAM-1 dependente de *T. gondii* foi significativamente reduzida na presença de TGF- β 1 ou IFN- γ . Além disso, existe uma correlação positiva entre expressão de ICAM-1 e índice de infecção por *T. gondii*. Em células BeWo, ambos TGF- β 1 e IFN- γ induziram aumento na porcentagem de células ICAM-1⁺ e, ao mesmo tempo, favoreceram a infecção por *T. gondii*, especialmente na presença de TGF- β 1. Assim, é possível especular que a alta expressão de ICAM-1 nessas condições esteja diretamente relacionada com a maior susceptibilidade de células BeWo à infecção por *T. gondii*. Entretanto, em células HeLa, ambos TGF- β 1 e IFN- γ promoveram redução na porcentagem de células ICAM-1⁺ induzida por *T. gondii* e, ao mesmo tempo, não favoreceram a infecção, especialmente na presença de IFN- γ . Assim, é possível especular que a baixa expressão de ICAM-1 nessas condições relaciona-se com o baixo índice de infecção em células HeLa. IFN- γ é uma citocina hábil em controlar a infecção por *T. gondii* (Carvalho et al., 2010; Oliveira et al., 2006; Silva; Langoni, 2009; Skariah; McIntyre; Mordue, 2010), porém, ao promover expressão de ICAM-1 em células BeWo, facilitaria a infecção destas células, justificando porque o tratamento com IFN- γ em células BeWo não foi atuante nesta população celular. Já TGF- β 1 é uma citocina que favorece a infecção por *T. gondii* (Barbosa et al., 2008; Nagineni et al., 2000), no entanto, ao reduzir a expressão de ICAM-1 previamente induzida por *T. gondii* em células HeLa, dificultaria a infecção destas células, justificando porque o tratamento com TGF- β 1 em células HeLa não foi diferente em relação ao controle quanto ao índice de infecção. Todos esses dados juntos demonstram pela primeira vez que ambos TGF- β 1 e IFN- γ regulam

diferentemente o número de células ICAM-1⁺ disponíveis para adesão e posterior invasão do parasito em células BeWo e HeLa, reforçando que o microambiente pode ser favorável ou não para a interação do parasito com a célula hospedeira.

Os resultados apresentados neste presente estudo estão de acordo com outros trabalhos. Windish e colaboradores (2009) também verificaram uma correlação existente entre expressão de ICAM-1 e TGF-β. A diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células T reguladoras Foxp3⁺ é dependente de TGF-β e ICAM-1. Linfócitos T CD4⁺ de camundongos nocautes para ICAM-1 foram incapazes de se diferenciar no perfil regulador (Treg), mesmo na presença de exógenos de TGF-β (Windish et al., 2009). IFN-γ, TNF-α e IL-1 também induziram a expressão de ICAM-1 em células BeWo, favorecendo a adesão de monócitos humanos infectados por *T. gondii* (Pfaff et al., 2005). Além do mais, IFN-γ, TNF-α e IL-1 também promoveram forte expressão de ICAM-1 em fibroblastos derivados de pulmão humano (Spoelstra et al., 1999). Adicionalmente, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que MIF foi capaz de aumentar a expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto de placentas humanas de primeiro trimestre (Ferro et al., 2008). Assim, é provável que MIF também favoreça expressão de ICAM-1 em células BeWo, mas experimentos futuros são necessários para comprovar esta hipótese.

Nós também investigamos a produção de TNF-α em células BeWo e HeLa nas condições que modularam ICAM-1 nestas células. Nossos resultados mostraram que todas as condições que regularam positivamente ICAM-1 em células BeWo e HeLa foram capazes de induzir liberação de TNF-α. Por outro lado, as condições experimentais que regulararam negativamente ICAM-1 em células HeLa reduziram a liberação de TNF-α. Diversos estudos já relataram o efeito de TNF-α na expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas humanas. Pfaff e colaboradores (2005) mostraram que a neutralização de TNF-α em células BeWo induziu uma significante diminuição na expressão de ICAM-1 nestas células. Gaffuri e

colaboradores (1998) também demonstraram aumento na expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas humanas de placenta a termo sob influência de TNF- α . Adicionalmente, TNF- α foi detectado em soro de gestantes com pré-eclâmpsia e foi a citocina responsável por regular forte expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas humanas de placenta de primeiro trimestre (Abe et al., 2008). A expressão de ICAM-1 induzida por TNF- α em células trofoblásticas parece ser dependente da via de sinalização de NF- κ B (Abe et al., 2008). No entanto, estudos recentes sugerem que a fosforilação de ERK1/2 pode estar envolvida na expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto de placenta a termo humanas (Lucchi et al., 2011).

ICAM-1 é uma potencial molécula de adesão da célula hospedeira para alguns patógenos, como *P. falciparum* (Dietrich, 2002), alguns vírus (Van de Stolpe; Van der Saag, 1996) e *T. gondii* (Barragan; Brossier; Sibley, 2005). Considerando que os resultados do presente estudo mostram que IFN- γ e TGF- β 1 regularam diferentemente ICAM-1 e índice de infecção em células BeWo e HeLa, nós realizamos experimentos no intuito de confirmar o papel de ICAM-1 na adesão de *T. gondii* a estas células. Quando células BeWo e HeLa tiveram a molécula ICAM-1 neutralizada por anticorpo específico, menor quantidade de parasitos aderidos às membranas das células foi observada em células ICAM-1⁺. Estes dados fornecem fortes evidências de que TGF- β 1 e IFN- γ favorecem infecção por *T. gondii* em células BeWo por aumentar a expressão de ICAM-1 na membrana plasmática, facilitando a adesão dos parasitos. Mas é muito provável que o parasito utilize outras estratégias para aderir e invadir nessas células. A descrição de ICAM-1 como uma molécula de adesão para *T. gondii* em células BeWo descreve apenas uma estratégia utilizada pelo parasito para infectar tecidos placentários e assim atravessar a interface materno-fetal. Outros trabalhos já mostraram o efeito de anticorpo neutralizante para ICAM-1, com importante redução na transmigração de *T. gondii* em células BeWo e Caco2 (células intestinais humanas)

(Barragan; Brossier; Sibley, 2005). A neutralização da molécula ICAM-1 com anticorpo a 10 μ g/mL também reduziu a adesão de monócitos infectados por *T. gondii* às células BeWo, diminuindo a transmissão do parasito dos monócitos para o trofoblasto, corroborando o potencial efeito de ICAM-1 na passagem transplacentária de *T. gondii* (Pfaff et al., 2005).

Assim, podemos concluir que TGF- β 1 e IFN- γ são importantes citocinas envolvidas na regulação positiva de ICAM-1 em células trofoblásticas BeWo, proporcionando alta taxa de adesão de *T. gondii* a estas células e, consequentemente, favorecendo a sua infecção. Por outro lado, TGF- β 1 e IFN- γ estão envolvidos na regulação negativa de ICAM-1 em células HeLa, dificultando a sua infecção. Nossos resultados adicionam novos dados sobre os efeitos de TGF- β 1, IFN- γ e ICAM-1 como efetivos elementos envolvidos na infecção por *T. gondii* em células BeWo e HeLa. Portanto, os dados aqui apresentados fornecem novas evidências das estratégias usadas por *T. gondii* para aderir e invadir em células trofoblásticas humanas, contribuindo para o entendimento de mecanismos atuantes na transmissão vertical da toxoplasmose.

FIGURAS

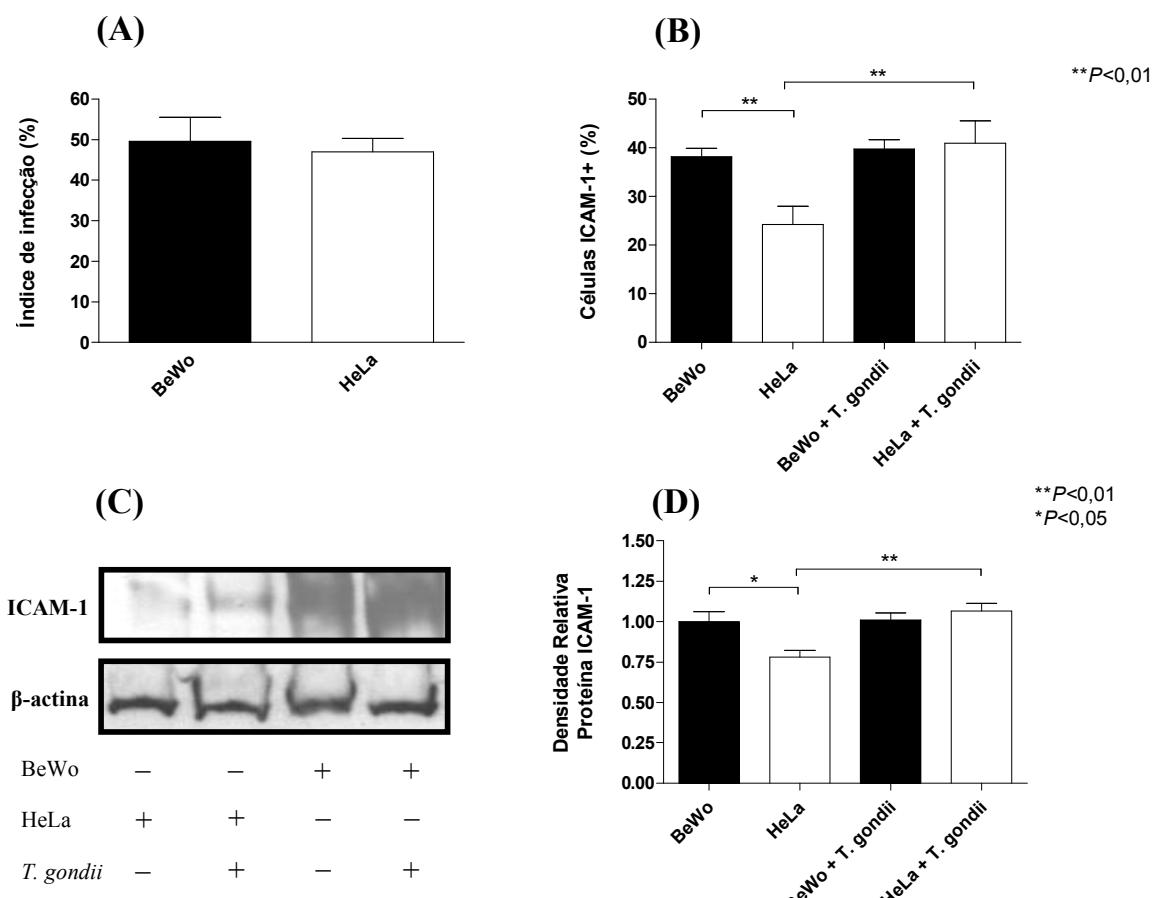
Figura 1

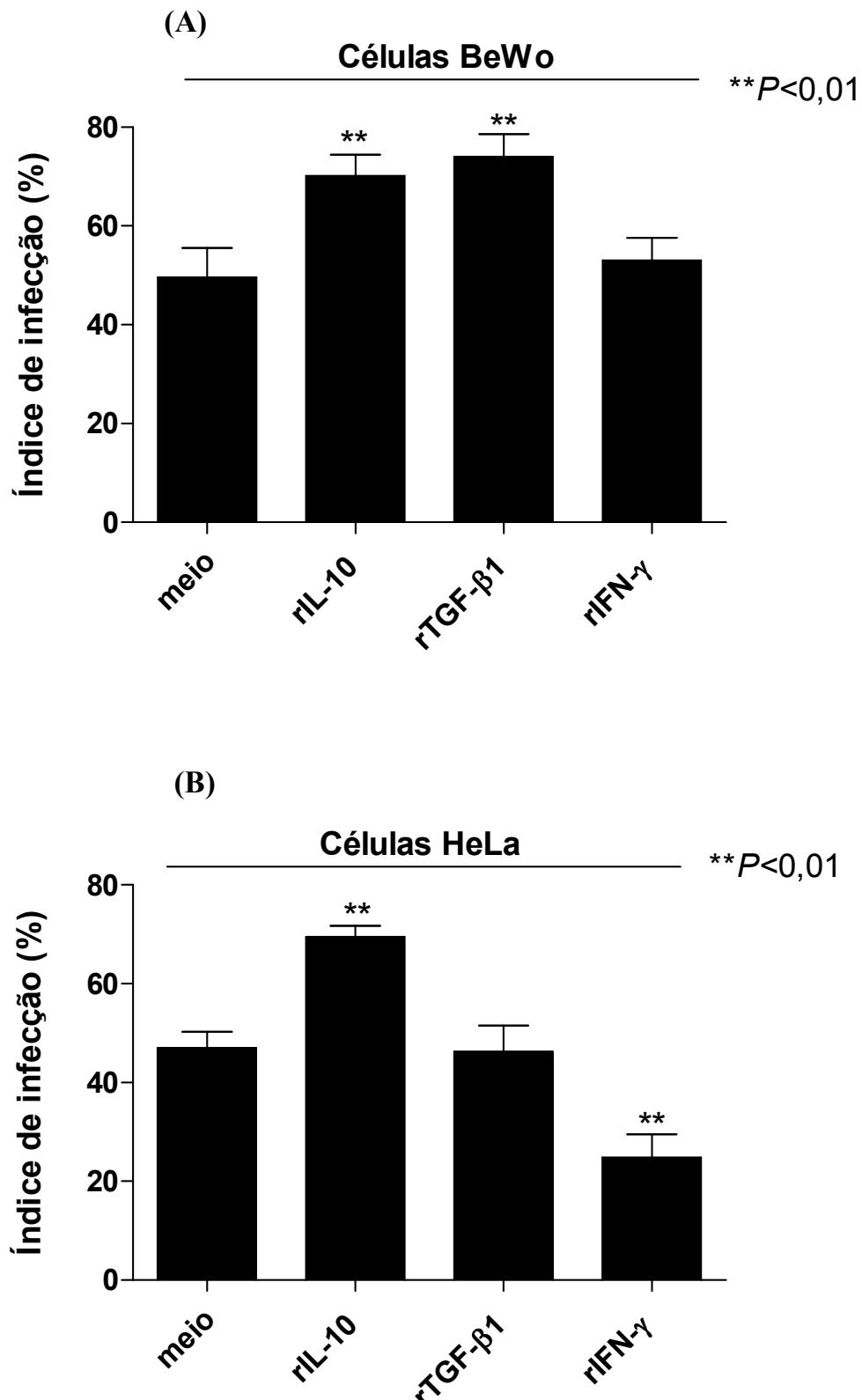
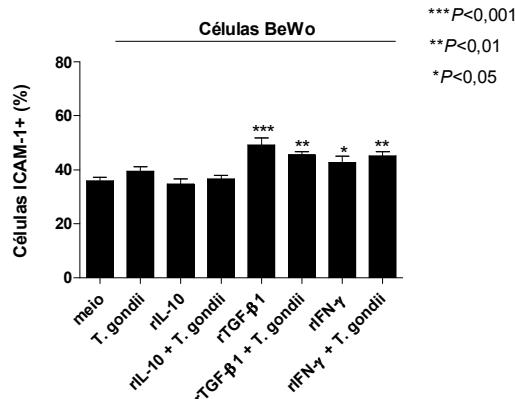
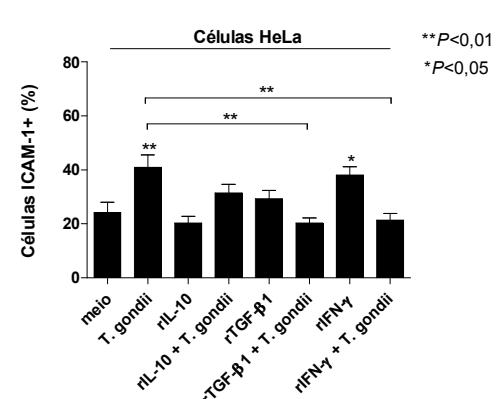
Figura 2

Figura 3

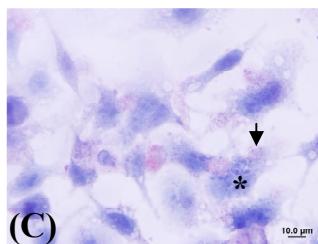
(A)



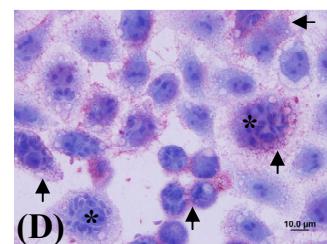
(B)



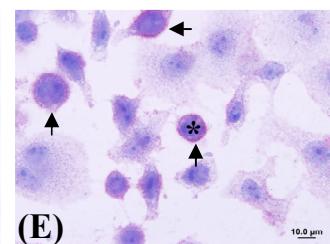
(C)



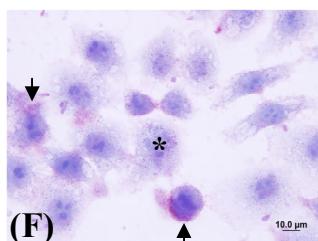
(D)



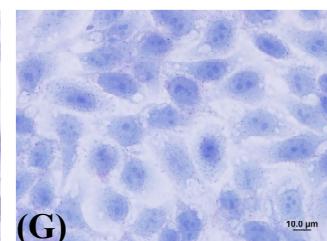
(E)



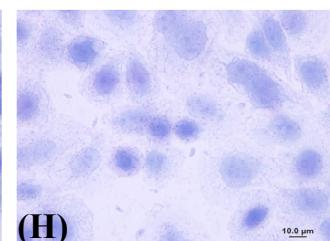
(F)



(G)



(H)



(I)

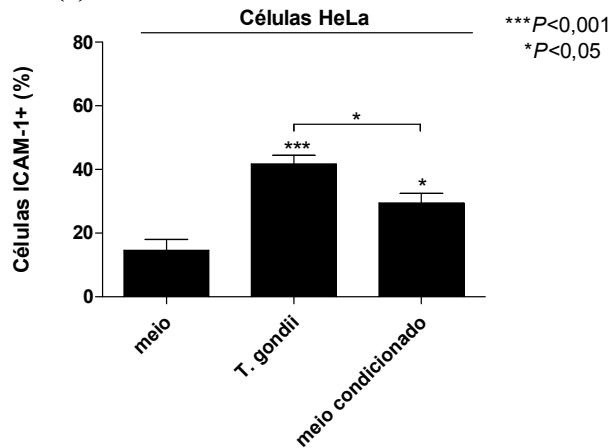


Figura 4

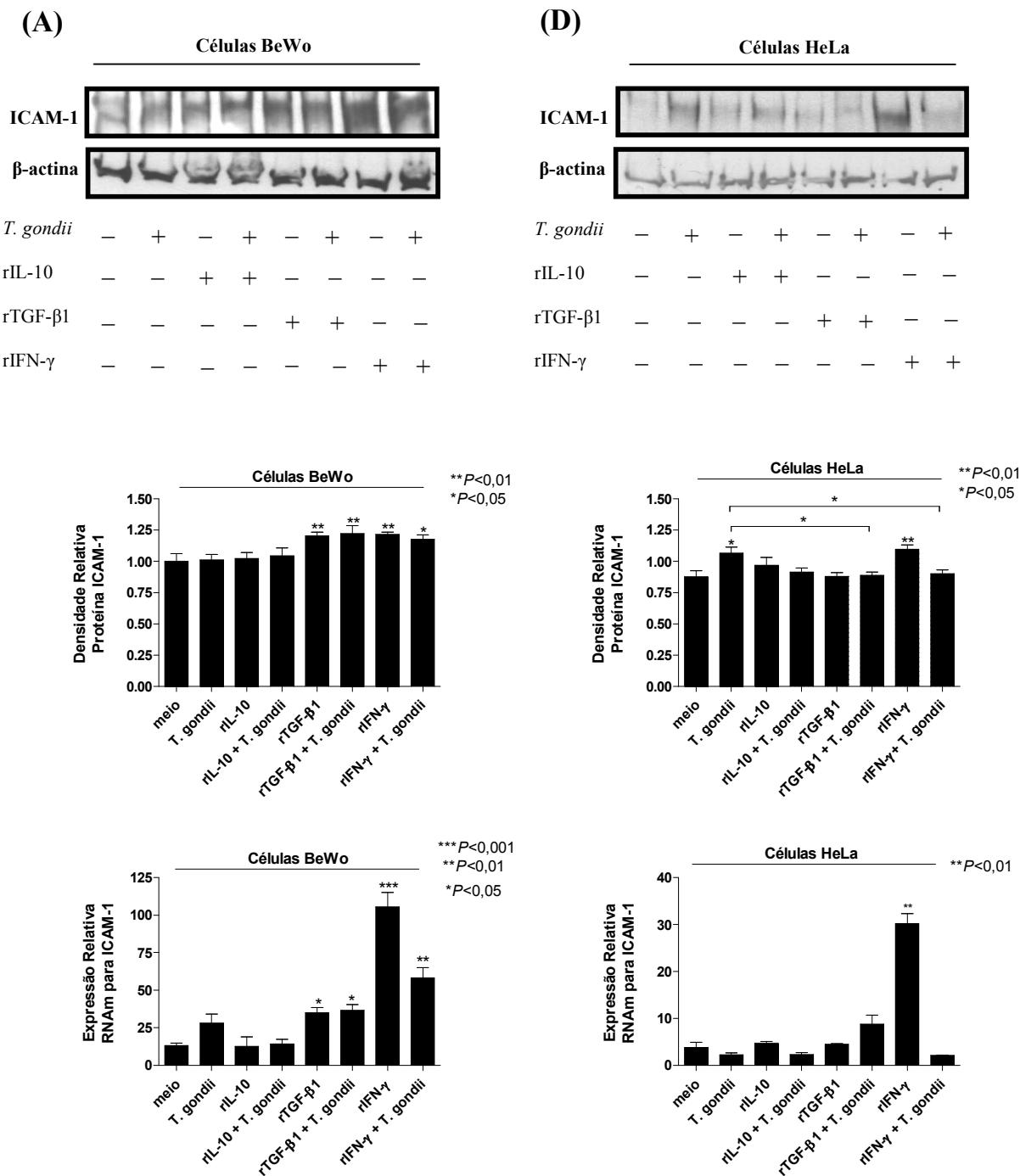


Figura 5

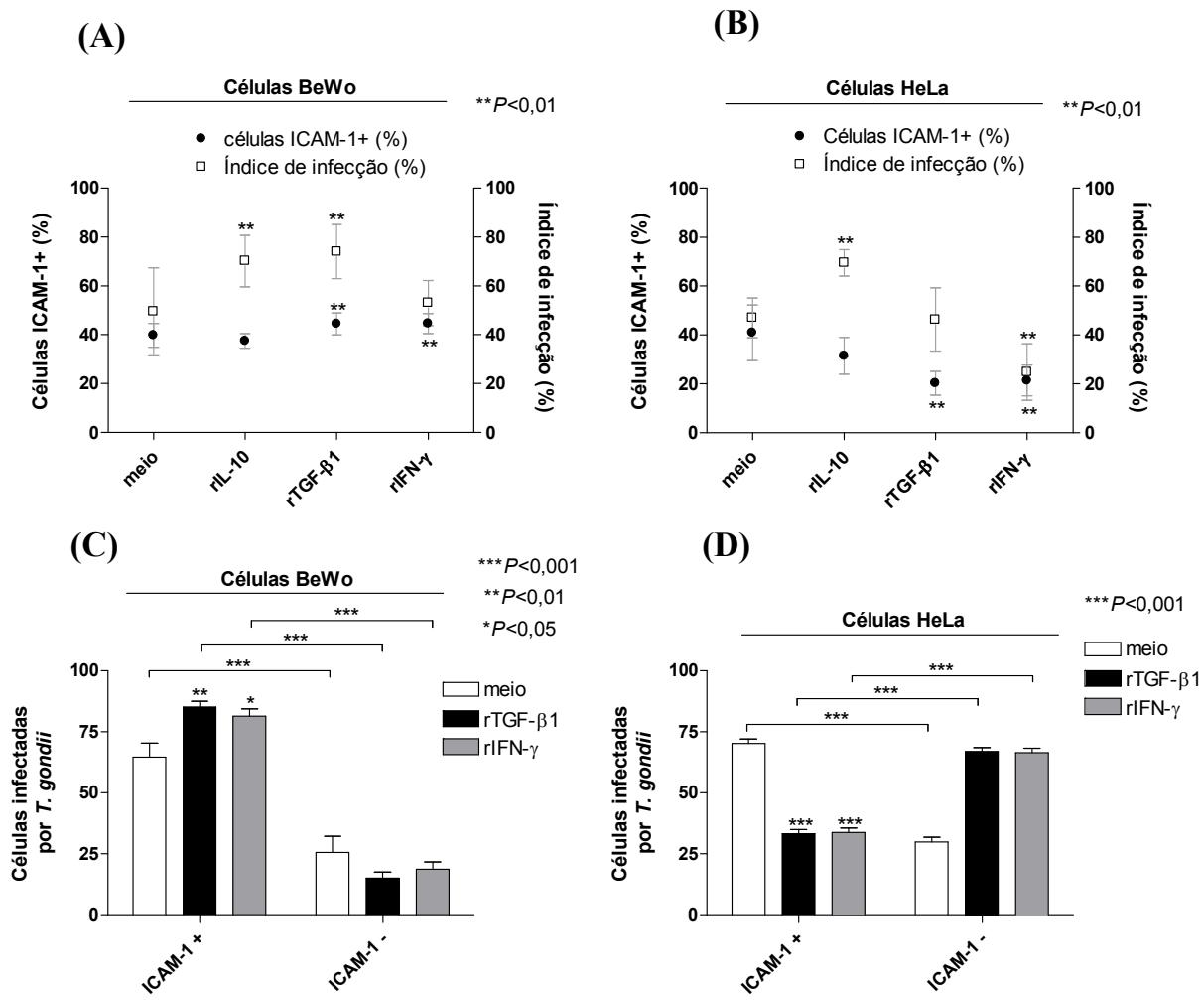


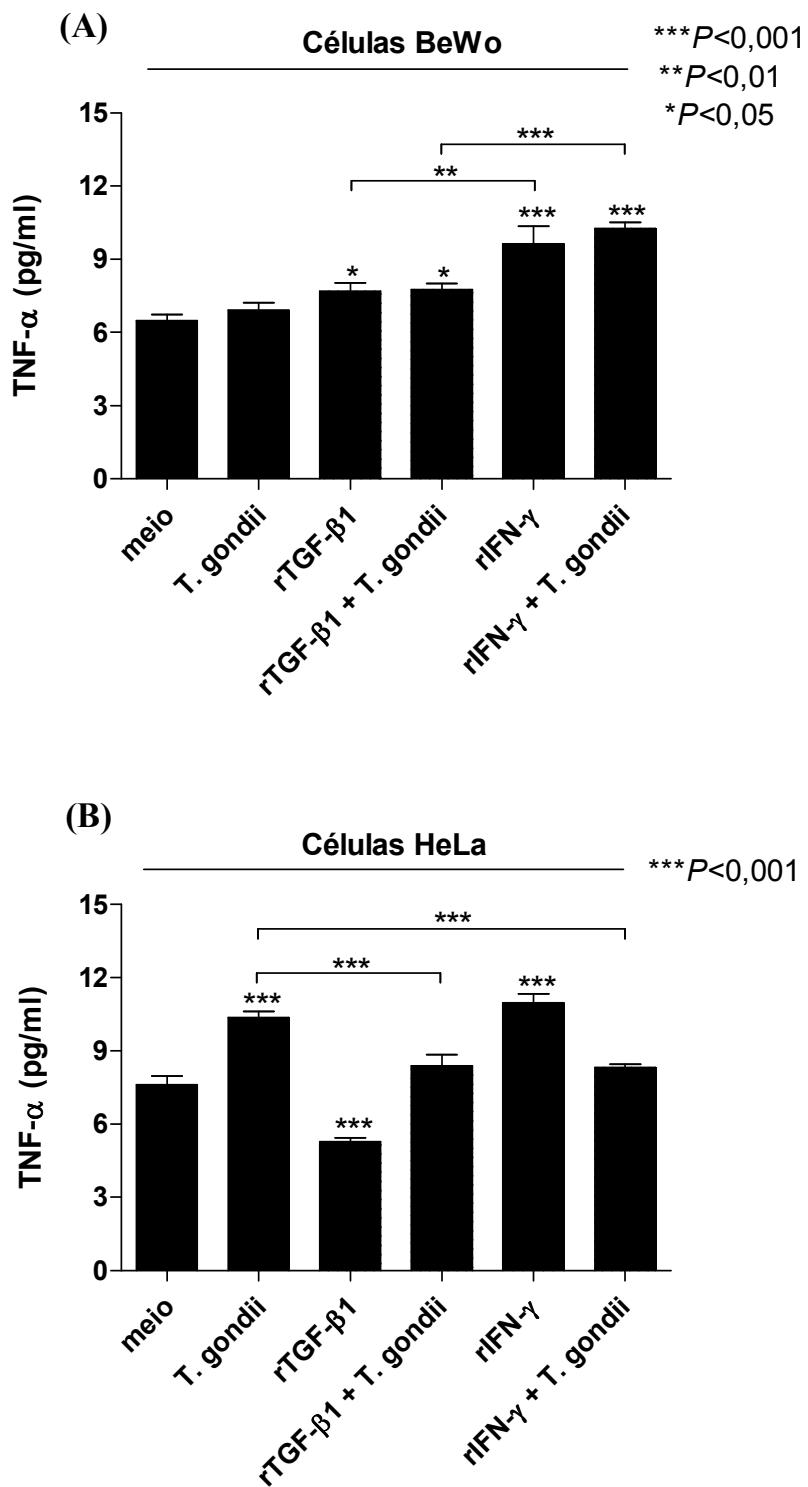
Figura 6

Figura 7

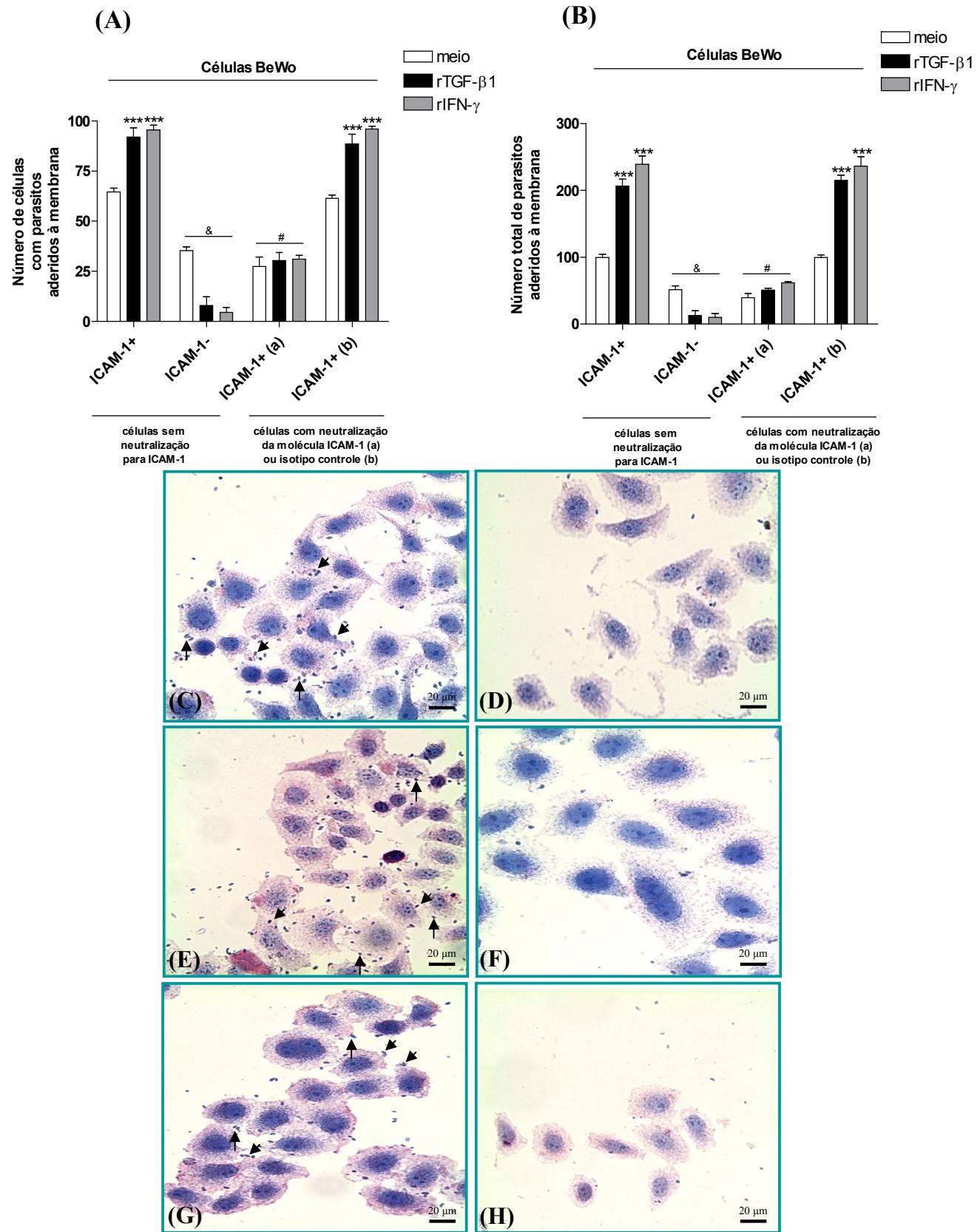
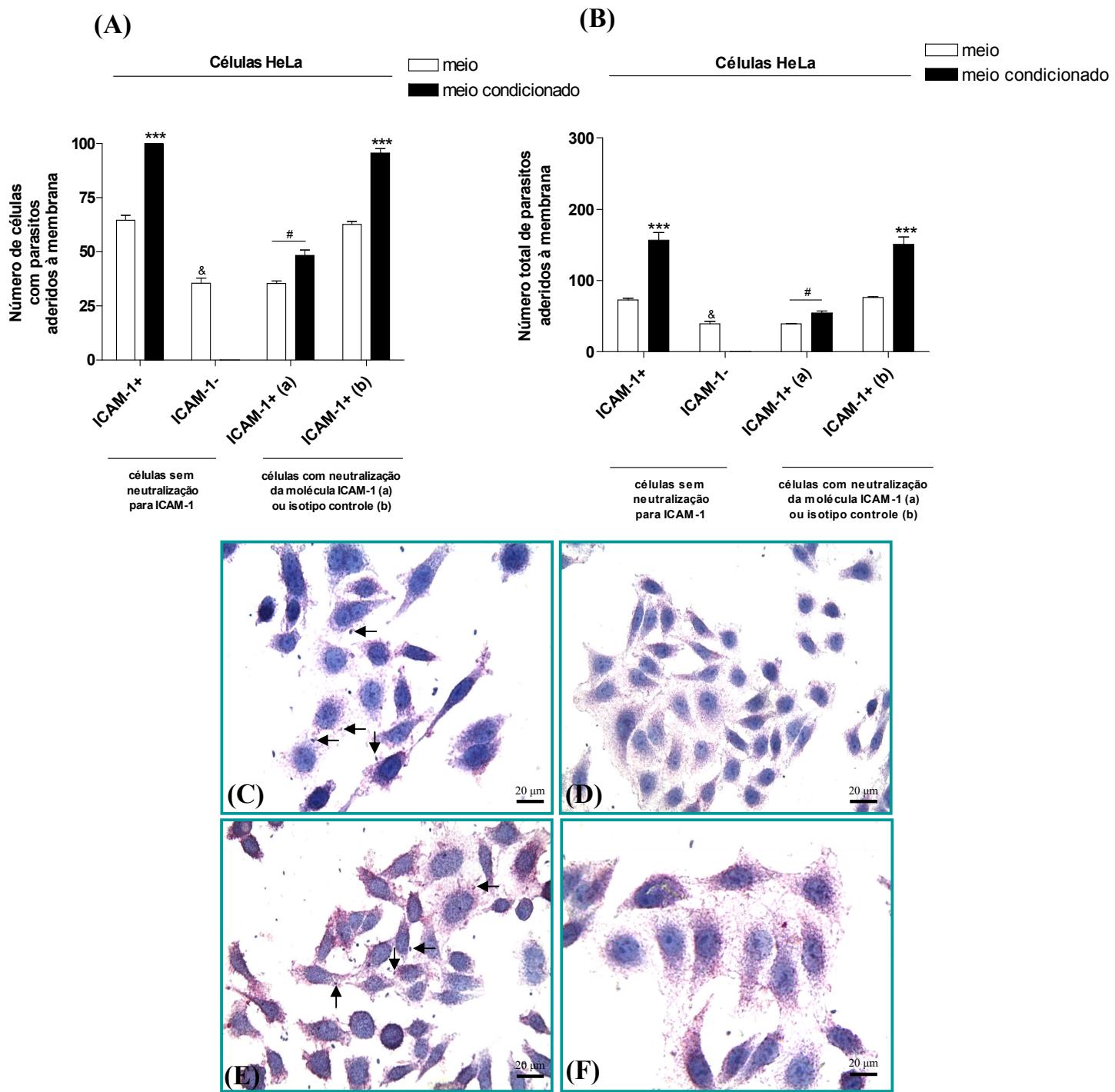


Figura 8



TABELAS

Tabela 1: Inibição (%) do número de células BeWo ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺ após neutralização da molécula ICAM-1.

Condições Experimentais Células BeWo	^a Número de células ICAM-1 ⁺ com parasitos aderidos à membrana			^b Número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1 ⁺		
	Média ± SEM sem neutralização de ICAM-1	Média ± SEM com neutralização de ICAM-1	^c Inibição (%)	Média ± SEM sem neutralização de ICAM-1	Média ± SEM com neutralização de ICAM-1	^c Inibição (%)
Meio	64.67±1.94	27.3±4.76 [#]	57.74%	99.8±4.49	39.3±6.2 [#]	60.63%
rTGF-β1	92.17±4.49 ^{***}	30.33±3.93 [#]	67.09%	206.7±10.25 ^{***}	50.67±2.83 [#]	75.49%
rIFN-γ	95.59±2.41 ^{***}	31±1.93 [#]	67.54%	239.3±12.2 ^{***}	61.33±2.1 [#]	74.38%

^a Média do número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana. ^b Média do número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺. As médias de ambos os parâmetros na ausência de neutralização de ICAM-1 correspondeu a 100%.

^c As taxas de inibição (%) foram calculadas subtraindo os valores obtidos das células não tratadas com anti-ICAM-1 daqueles valores obtidos de células tratadas com anti-ICAM-1, de acordo com a fórmula descrita na sessão de material e métodos.

*** $P<0,001$ em comparação com células não tratadas (meio) e $^{\#}P<0,001$ em comparação com células na ausência de neutralização da molécula ICAM-1. Teste One Way Anova com pós teste de múltiplas comparações Bonferroni.

Tabela 2: Inibição (%) do número de células HeLa ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺ após neutralização da molécula ICAM-1.

Condições Experimentais Células HeLa	^a Número de células ICAM-1 ⁺ com parasitos aderidos à membrana			^b Número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1 ⁺		
	Média ± SEM sem neutralização de ICAM-1	Média ± SEM com neutralização de ICAM-1	^c Inibição (%)	Média ± SEM sem neutralização de ICAM-1	Média ± SEM com neutralização de ICAM-1	^c Inibição (%)
Meio	64.5±2.39	35.33±1.11 [#]	45.28%	72.83±2.41	39.00±0.73 [#]	46.46%
Meio condicionado	100±0.0***	37.67±1.47 [#]	62.34%	156.7±10.36***	54.33±2.56 [#]	65.32%

^a Média do número de células ICAM-1⁺ com parasitos aderidos à membrana. ^b Média do número total de parasitos aderidos à membrana em células ICAM-1⁺. As médias de ambos os parâmetros na ausência de neutralização de ICAM-1 correspondeu a 100%.

^c As taxas de inibição (%) foram calculadas subtraindo os valores obtidos das células não tratadas com anti-ICAM-1 daqueles valores obtidos de células tratadas com anti-ICAM-1, de acordo com a fórmula descrita na sessão de material e métodos.

*** $P<0,001$ em comparação com células não tratadas (meio) e [#] $P<0,001$ em comparação com células na ausência de neutralização da molécula ICAM-1. Teste One Way Anova com pós teste de múltiplas comparações Bonferroni.

CAPÍTULO II

Papel das vias de sinalização intracelulares ativadas por IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ na susceptibilidade diferencial à infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (BeWo) e células epiteliais uterinas humanas (HeLa)

1. INTRODUÇÃO

O estudo a respeito das sinalizações intracelulares em diversos tipos celulares levou a descoberta de várias vias, como, por exemplo, a descoberta das Janus Kinases (JAKs) e dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs) (O'Shea; Murray, 2008).

As citocinas, na grande maioria das vezes, ativam cascatas intracelulares por intermédio de ligação aos seus respectivos receptores. Alguns receptores celulares apresentam atividade enzimática intrínseca, porém os receptores para citocinas não possuem esta especialidade, sendo dependentes de kinases associadas às suas caudas citoplasmáticas. Estas kinases citoplasmáticas compreendem quatro membros da família JAK: JAK-1, JAK-2, JAK-3 e a tirosina kinase tipo 2 (TyK2), que se associam a uma gama de receptores (O'Shea; Murray, 2008). E, com relação aos fatores de transcrição STAT, existem sete membros: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b e STAT-6, que regularizam a expressão de genes ao se ligarem às regiões promotoras específicas no DNA da célula (Shuai; Liu, 2003).

1.1. Sinalização intracelular ativada por IFN- γ

A ligação de IFN- γ ao seu receptor específico na superfície celular ativa uma via intracelular dependente de JAK-STAT (Rakesh; Agrawal, 2005). O receptor específico para IFN- γ (IFN γ GR) consiste em duas subunidades protéicas transmembrânicas denominadas IFN γ GR-1 e IFN γ GR-2. Estes receptores não possuem atividade catalítica própria, por isso suas caudas citoplasmáticas estão associadas às enzimas kinases JAK-1 e JAK-2. IFN- γ liga-se especificamente a IFN γ GR-1, o que induz à fosforilação da sua porção citoplasmática pela JAK-1, que está constitutivamente associada a esta subunidade do receptor para IFN- γ . Simultaneamente, JAK-2 fosforila a subunidade IFN γ GR-2. A fosforilação de IFN γ GR-1 pela

JAK-1 gera sítios ligantes para STAT-1 que, ao se ligarem à cauda fosforilada de IFN γ R-1, sofrem fosforilação pela JAK-1 nos seus resíduos de tirosina, especificamente o resíduo 701 (T⁷⁰¹). A fosforilação de STAT-1 no seu resíduo T⁷⁰¹ leva à formação de homodímeros de STAT-1 que migram em direção ao núcleo da célula para ativar genes regulados por IFN- γ . Os homodímeros de STAT-1 ligam-se às seqüências ativadoras de gama (GAS) no DNA da célula e promovem a ativação desses genes (**Figura I**) (Croker; Kiu; Nicholson, 2008; Hanada; Yoshimura, 2002; Platanias; Fish, 1999; Saha et al., 2010).

O fator de transcrição STAT-1, ativado por IFN- γ , também sofre fosforilação nos seus resíduos de serina, mais especificamente no resíduo 727 (S⁷²⁷). Apesar desta fosforilação não influenciar na formação de homodímeros de STAT-1 ou na migração destes homodímeros para DNA celular, a fosforilação de S⁷²⁷ é importante na transcrição de genes regulados por IFN- γ (Decker; Kovarik, 2000; Wen et al., 1995; Zhu et al., 1997). Adicionalmente, tem sido proposto que, na ausência de STAT-1, IFN- γ possa ativar outras STATs, como STAT-3 (Murray, 2007; Qing; Stark, 2004; Saha et al., 2010).

Dentre os vários genes ativados por IFN- γ , o fator regulador de IFN tipo 1 (IRF-1) é de extrema importância (**Figura I**). IRF-1 é um fator de transcrição ativado por IFN- γ , sua regulação é dependente da via JAK-STAT (Tamura et al., 2008) e é capaz de induzir a expressão de várias proteínas que exercem funções fundamentais na resposta imune contra microorganismos patogênicos (Saha et al., 2010). IRF-1 ativa genes que codificam proteínas desencadeantes da apoptose, como caspases e a proteína *p21*, além de proteínas relacionadas ao processamento antigênico (TAP-1 e TAP-2) no interior das APCs, proteínas que constituirão as subunidades proteassômicas (LMP-2, LMP-7 e LMP-10) e proteínas que formarão o MHC-II (Harada et al., 1998). Adicionalmente, IRF-1 está relacionado à indução da expressão da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), iNOS e à produção de IL-12 (Saha et al., 2010).

A ativação da via JAK-STAT por IFN- γ ocorre em um grande número de células, incluindo macrófagos (Han et al., 2010), fibroblastos, astrócitos, micróglia (Saha et al., 2010), células HeLa e trofoblasto humano (Choi et al., 2007). Células HeLa e as linhagens de coriocarcinoma humano Jar, JEG-3 e BeWo apresentam receptores para IFN- γ (Choi et al., 2007; Entrican et al., 2002). No entanto, células Jar e JEG-3 estimuladas com IFN- γ apresentaram fosforilação de JAK-1, JAK-2 e STAT-1 reduzidas quando comparado às células HeLa (Choi et al., 2007). Esta reduzida fosforilação da via JAK-STAT em células Jar e JEG-3 foi acompanhada por menor expressão de genes regulados por IFN- γ , como IRF-1, LMP-2 e LMP-7 (Choi et al., 2007).

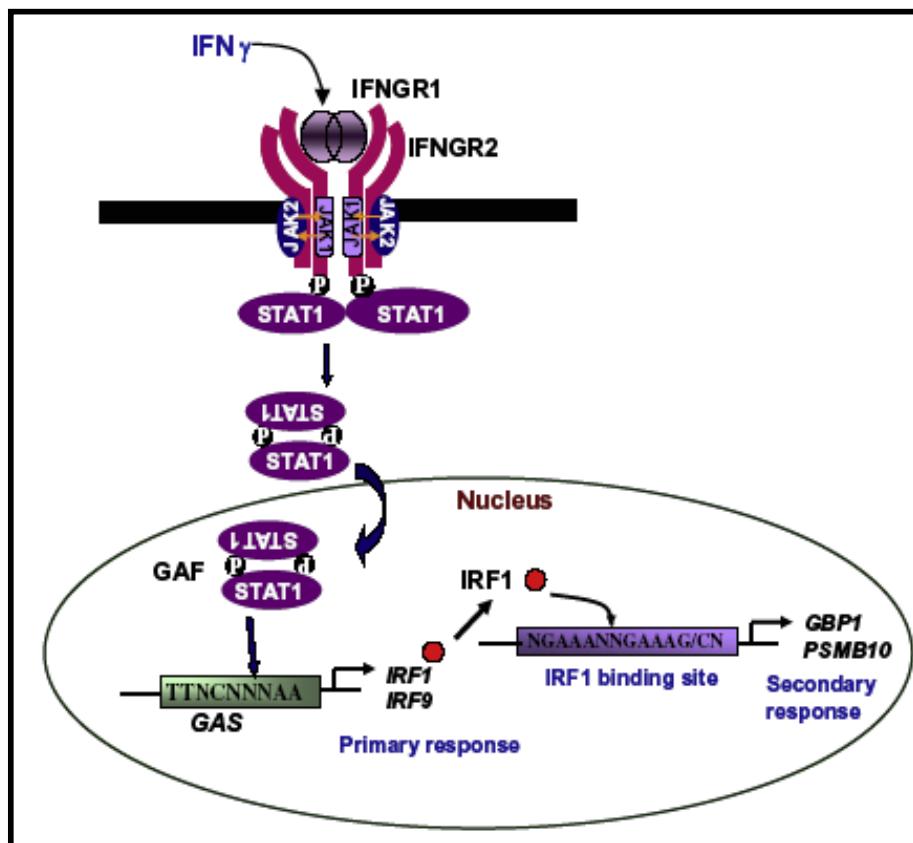


Figura I: Mecanismos moleculares da sinalização intracelular induzida por IFN- γ . A ligação de IFN- γ ao seu receptor específico induz à fosforilação das JAKs e, posteriormente, das porções intracelulares dos receptores, o que permite o recrutamento e a fosforilação das STAT-1. Homodímeros de STAT-1 migram para o núcleo celular, ativam GAS (seqüências ativadas por gama) e regulam a transcrição de genes específicos como IRF-1 que, por sua vez, induz à ativação de outros genes (Saha et al., 2010).

1.2. Sinalização intracelular ativada por IL-10

A cascata de sinalização ativada por IL-10 também usa a via JAK-STAT, semelhante à via de IFN- γ . IL-10 se liga ao seu receptor específico presente na superfície celular, constituído de duas subunidades: IL-10R1 (cadeia α) e IL-10R2 (cadeia β). JAK-1 se associa a IL-10R1, e Tyk2 se associa a IL-10R2 (Donnelly et al., 1999).

O estímulo de células com IL-10 promove a associação das duas cadeias de receptores, que agora adquirem uma configuração tetramérica. A formação deste complexo direciona a ativação das proteínas quinases associadas ao receptor, JAK-1 e TyK-2 que, por sua vez, vão fosforilar as caudas citoplasmáticas do receptor bem como os resíduos de tirosina de fatores de transcrição, principalmente STAT-3, propiciando a expressão de genes anti-inflamatórios. O domínio intracelular da cadeia IL-10R1 possui resíduos de tirosina que são fosforilados pelas JAKs e atraem STAT-3 (Cheon et al., 2006; Donnelly et al., 1999). JAK-1 fosforila os resíduos de tirosina de STAT-3, especialmente o resíduo 705 (T^{705}), levando à formação de homodímeros que translocam-se para o núcleo celular. Posteriormente ocorre fosforilação dos resíduos de serina de STAT-3 (S^{727}), porém esta fosforilação ocorre apenas após a migração de homodímeros de STAT-3 para o núcleo (**Figura II**) (Shen et al., 2004). Receptores para IL-10 já foram descritos em células do sistema imunológico, bem como no trofoblasto humano em todos os períodos gestacionais (Hanna et al., 2000).

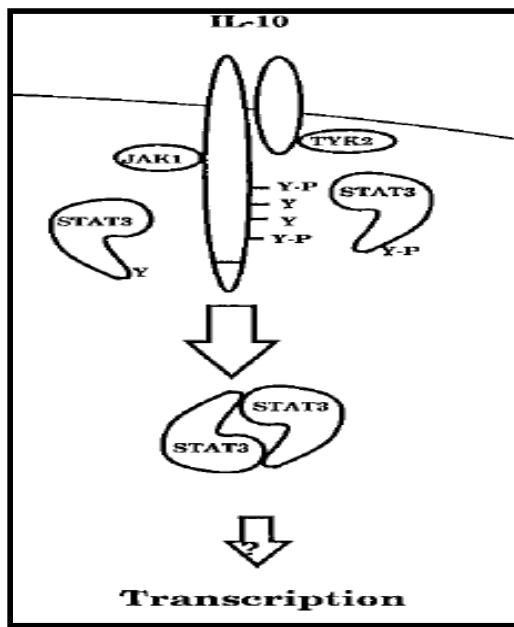


Figura II: Mecanismos moleculares da sinalização intracelular mediada por IL-10. A ligação de IL-10 ao seu receptor específico induz à fosforilação das kinases JAK-1 e Tyk2, que fosforilam as porções intracelulares do receptor que, por sua vez, atraem STAT-3 para que esta seja fosforilada pelas kinases (Hamilton et al., 2002).

A ativação de STAT-3 por diversas citocinas, incluindo IL-11, IL-6, fator inibitório de leucemia (LIF) e IL-10, exerce importante função na interface materno-fetal (Fitzgerald et al., 2008; Makrigiannakis et al., 2006). A fosforilação de STAT-3 por essas citocinas participa do processo de deciduização e da migração de células trofoblásticas extravilosas (Dimitriadis et al., 2006; Paiva et al., 2007). Além disso, a ativação de STAT-3 por IL-11 é necessária para regular a capacidade invasora de células trofoblásticas JEG-3, uma vez que quando estas células são silenciadas para STAT-3 com uso de RNA de interferência, o potencial invasivo e migratório delas caem significativamente (Suman et al., 2009).

De maneira semelhante às citocinas, *T. gondii* também é capaz de fosforilar e ativar STAT-3. O parasito induziu a fosforilação de STAT-3 e reduziu a produção das citocinas IL-12 e TNF- α em macrófagos murinos. Esses dados sugerem que *T. gondii* regula a via de STAT-3 como um mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro (Butcher et al., 2005). Além disso, a ativação de STAT-3 por *T. gondii* foi independente de IL-10 ou IL-6, já que a fosforilação de STAT-3 induzida pelo parasito permaneceu em animais infectados e nocautes para estas citocinas (Butcher et al., 2005). No entanto, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que IL-10 foi importante na susceptibilidade de células BeWo à infecção por *T. gondii* (Barbosa et al., 2008). Assim, é plausível especular que *T. gondii* faça uso de STAT-3 na interface materno-fetal, de um modo dependente de IL-10 ou IL-6, para favorecer a sua replicação e a sua passagem para tecidos fetais.

1.3. Sinalização intracelular ativada por TGF- β

TGF- β é um fator de crescimento pertencente à superfamília dos fatores de crescimento beta, que também incluem as inibinas e activinas (Kitisín et al., 2007). As isoformas de TGF- β (TGF- β 1, 2 e 3) são liberadas na célula como precursores latentes, necessitando serem ativados para exercerem as suas funções biológicas, como a participação

no desenvolvimento embrionário, quimiotaxia, controle do ciclo celular e regulação da resposta imune (Verrecchia et al., 2006).

Os receptores tipo I e II para TGF- β possuem um domínio intracelular com atividade quinase serina-treonina para mediadores intracelulares conhecidos como proteínas Smads. A cascata de sinalização induzida por TGF- β está esquematizada na **figura III**. Na presença de TGF- β , os dois tipos de receptores se juntam e formam uma estrutura estável. O domínio quinase do receptor tipo II fosforila e ativa os receptores tipo I que, por sua vez, fosforilam R-Smads (Smad-2 e Smad-3) em seus resíduos de serina ($S^{465/467}$). As R-Smads são recrutadas em direção aos receptores tipo I e interagem com Smad-4 (Co-Smad) formando um complexo que migra em direção ao núcleo celular e estimula a expressão de genes (Hanada; Yoshimura, 2002; Kitisin et al., 2007; Santibañez; Quintanilla; Bernabeu, 2011; Verrecchia et al., 2006).

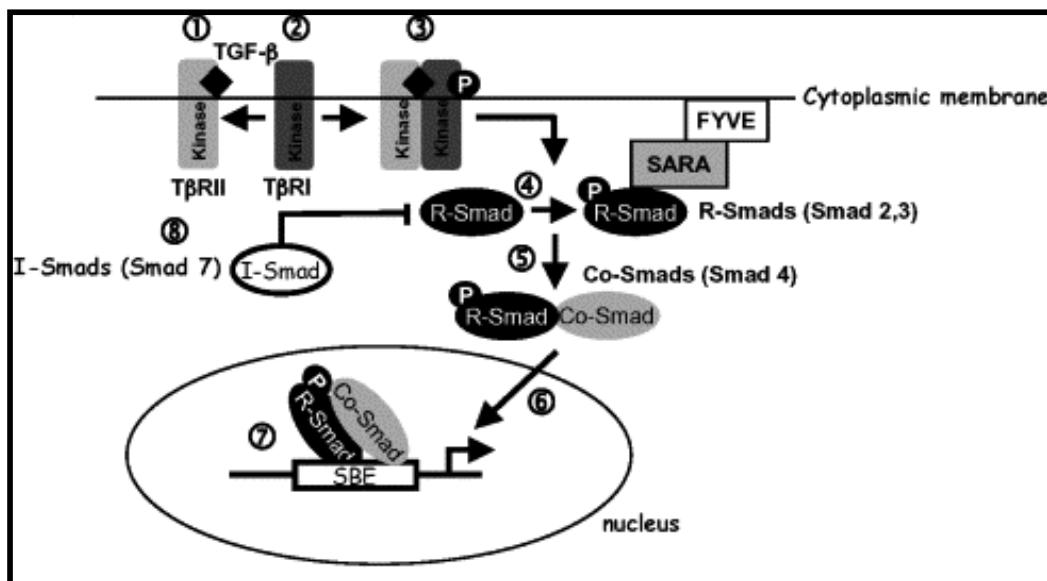


Figura III: Mecanismos moleculares da sinalização intracelular induzida por TGF- β . A ligação de TGF- β ao seu receptor específico induz à sinalização via proteínas Smads: TGF- β liga-se ao receptor tipo II (T β RII) promovendo o recrutamento e a fosforilação do receptor tipo I (T β RI) que, por sua vez, fosforila R-Smads. R-Smads ligadas a grupos fosfato associam-se com Co-Smad, formando um hetero-complexo que migra em direção ao núcleo celular, onde poderá se ligar à seqüências de DNA que regulam a expressão de genes induzidos por essa citocina (Verrecchia et al., 2006).

TGF- β já foi detectado em tecidos placentários humanos (Frolik et al., 1983), além de ser expresso pelo endométrio humano em diferentes estágios do ciclo menstrual, propiciando uma rápida proliferação celular e remodelagem tecidual (Jones et al., 2006). A produção e secreção de TGF- β e activinas pelas glândulas epiteliais do endométrio sugerem o seu envolvimento na preparação do endométrio para a implantação do embrião. A expressão de TGF- β é também observado na massa celular interna e no trofoblasto (Chow et al., 2001). Entretanto, as diferentes isoformas da citocina estão distribuídas de acordo com o tipo celular, pois as isoformas TGF- β 1 e 2 são mais abundantes no citotrofoblasto, enquanto que TGF- β 2 também possui expressão nas células deciduais e TGF- β 3 de expressão exclusiva nas células imunes maternas (Ando et al., 1998; Simpson et al., 2002). Estudos revelaram que TGF- β é capaz de regular a expressão de aromatase, enzima essencial na produção de estrógeno, em células trofoblásticas JEG-3 e este efeito foi dependente da fosforilação de Smad-2 por TGF- β (Zhou et al., 2009).

O aumento da replicação de *T. gondii* sob estímulo de TGF- β já foi antes observado em células epiteliais pigmentares da retina humana (Nagineni et al., 2002). Este estudo demonstrou que *T. gondii* influencia na expressão de RNAm para TGF- β e aumenta a secreção de TGF- β 1 e 2, ao mesmo tempo que torna o meio favorável à proliferação do parasito (Nagineni et al., 2002). Similares resultados foram observados quando a adição de TGF- β 1 recombinante em macrófagos peritonais murinos ou em macrófagos humanos aumentou a replicação intracelular de *Leishmania braziliensis* e *T. cruzi* (Barral-Netto et al., 1992; Silva et al., 1991). Em estudos prévios do nosso grupo, TGF- β 1 induziu ao aumento do índice de infecção e da proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo (Barbosa et al., 2008). Assim, é possível que TGF- β 1 ative a sinalização intracelular mediada por Smads em células BeWo para favorecer a infecção por *T. gondii* nesta população celular.

2. JUSTIFICATIVA

Nossos estudos prévios demonstraram que as citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 induziram a um aumento na proliferação intracelular e na invasão celular de *T. gondii* em células trofoblásticas BeWo (Barbosa et al., 2008). No entanto, IFN- γ reduziu significativamente a proliferação e a invasão celular do parasito em células HeLa (Barbosa et al., 2008). Para entender os efeitos diferenciais dessas citocinas em células BeWo e HeLa, é fundamental investigar os mecanismos intracelulares ativados por elas, ou seja, analisar as vias de sinalização intracelular induzidas por IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 e os possíveis efeitos da neutralização dessas vias na infecção por *T. gondii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção de células BeWo e HeLa em cultura

Células BeWo e HeLa foram adquiridas do ATCC e mantidas em cultura nas mesmas condições descritas no Capítulo I. Brevemente, as células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 10.000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, de acordo com Barbosa e colaboradores (2008).

3.2. Manutenção da cepa RH de *T. gondii* em cultura

Os parasitos foram primeiramente mantidos *in vivo* na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (Mineo et al., 1980), como descrito anteriormente no Capítulo I. Posteriormente, os taquizoítas retirados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss previamente infectados foram centrifugados a 400g por 5 minutos, contados em câmara de

Newbauer e adicionados em frascos de cultura contendo células BeWo e HeLa com a finalidade de manter parasitos *in vitro* para os futuros procedimentos experimentais.

3.3. Manutenção da cepa 2F1 de *T. gondii* em cultura

Os taquizoítas da cepa 2F1 de *T. gondii*, que são derivados da cepa RH e que expressam o gene da enzima β -galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos em células HeLa cultivadas em meio RPMI a 2% de soro. À medida que a grande maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres foi centrifugado a 400g por 5 minutos, os parasitos homogeneizados em meio a 2% de soro e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

3.4. Infecção por *T. gondii* (cepa 2F1 ou RH) e tratamento com citocinas em células BeWo e HeLa

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 2×10^4 células a cada 200 μ l de meio. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e permaneceram por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram pré-tratadas com rTGF- β 1, rIL-10 (ambas a 50ng/ml) ou rIFN- γ (20ng/ml) por mais 24 horas. Depois, as células foram infectadas com a cepa 2F1 de *T. gondii* (5:1), incubadas durante 3 horas e, após lavagens para retirada de parasitos não aderentes, as células foram novamente tratadas com rTGF- β 1, rIL-10 ou rIFN- γ nas mesmas concentrações por adicionais 24 horas. Como controle, as células foram infectadas e não tratadas. Finalmente, as células

foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* através da reação de β -galactosidase (Teo et al., 2007). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Em outra abordagem experimental, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^5 células/200 μ l) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram pré-tratadas com rTGF- β 1, rIL-10 (ambas a 50ng/ml) ou rIFN- γ (20ng/ml) por mais 24 horas, infectadas por *T. gondii* (cepa RH, 5:1) e, depois de 3 horas, as células foram lavadas para retirar parasitos não aderentes e novamente tratadas com as citocinas recombinantes nas mesmas concentrações por adicionais 24 horas. Como controle, as células não foram tratadas e nem infectadas ou somente infectadas. Finalmente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA Captura ou Citometria de Fluxo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.5. Ensaio de proliferação de *T. gondii* (cepa 2F1)

O ensaio de proliferação de *T. gondii* (2F1) foi realizado de acordo com Teo e colaboradores (2007), com pequenas modificações. Brevemente, amostras de parasitos 2F1 (curva padrão: de 1×10^6 a $15,625 \times 10^3$ parasitos totais) e células BeWo e HeLa infectadas foram lisadas com 100 μ l de tampão de lise RIPA [50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% (peso/volume) de deoxicolato de sódio e 0,1% (peso/volume) de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] (Sigma) durante 30 minutos, incubadas com 100 μ l de tampão de ensaio (PBS a 100mM pH7,3; 9mM de MgCl₂ e 102mM de β -mercaptoetanol) e 40 μ l de CPRG (chlorophenol red-D-galactopyranoside; Roche Diagnostic) a 6,25mM por adicionais 30 minutos. Após este período, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570nm usando leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) e os dados foram apresentados como índice de proliferação

de *T. gondii* (β -Gal) de acordo com a referência da curva padrão (limite de detecção da reação de $15,625 \times 10^3$ parasitos totais).

3.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para IL-10, TGF- β 1 e MIF

As concentrações de IL-10, TGF- β 1 e MIF nos sobrenadantes de células BeWo e HeLa foram mensuradas por ELISA Captura, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (BD Biosciences) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-humanos específicos para cada citocina por 12 horas a temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas com PBS-T (0,05%) e bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente com PBS mais 1% de soro albumina bovina (BSA) para as citocinas IL-10 e MIF ou PBS-T (5%) mais 0,05% de azida sódica para TGF- β 1. Após novas lavagens em PBS-T, 50 μ l das curvas de cada citocina (de 4000pg/ml a 62,5pg/ml para IL-10 e MIF; e de 2000pg/ml a 31,25pg/ml para TGF- β 1) ou 50 μ l das amostras de sobrenadantes de células BeWo e HeLa foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpos de detecção anti-citocinas humanas conjugados com biotina durante 2 horas a temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada às placas e permaneceu em incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram demonstrados em pg/ml de acordo com a referência da curva padrão. Os limites de detecção do ensaio foram de 62,5pg/ml para IL-10 e MIF e 31,25pg/ml para TGF- β 1.

No ensaio de detecção para TGF- β 1, os sobrenadantes foram primeiramente tratados com soluções de ácido e base para ativar a citocina presente na amostra, uma vez que TGF- β é secretado pelas células como um complexo inativo. O tratamento procedeu-se da seguinte forma: 10 μ l de HCl 1M foi misturado aos 50 μ l de sobrenadante e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 10 μ l de solução contendo 1,2 M de NaOH e 0,5M de Hepes foi adicionada aos sobrenadantes previamente incubados com HCl para neutralizar a ação do ácido e, em seguida, as amostras foram colocadas nas placas de ELISA.

3.7. Dosagem de citocinas do perfil Th1/Th2 e IL-17A por citometria de fluxo

As citocinas humanas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17A) nos sobrenadantes de células BeWo e HeLa foram mensuradas usando o kit Th1/Th2/IL-17A “Cytometric Bead ArrayTM” (CBA) (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras de sobrenadantes foram misturadas com uma mistura de “*beads*” de captura para cada citocina a ser quantificada. Após a mistura, foram adicionados os anticorpos anti-humanos conjugados com ficoeritrina (PE) para IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17A por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os tubos foram então centrifugados (400g por 7 minutos) e os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e descartados. O “*pellet*” contendo as “*beads*” foi homogeneizado e analisado por citometria de fluxo. As amostras foram lidas no citômetro FACSCalibur BDTM (BD Company, San Diego, CA, EUA) e os dados foram analisados pelo software BDTM Cell Quest e CBA software. Os resultados foram apresentados em pg/ml de acordo com a referência das curvas padrões de cada citocina. Os limites de detecção de cada citocina foram: 20,25pg/ml para IL-2; 19,7pg/ml para IL-4; 19,53pg/ml para IL-10; 20,16pg/ml para IL-6; 20,37pg/ml para IFN- γ ; 20,12pg/ml para TNF- α ; e 19,1pg/ml para IL-17A.

3.8. Cinética da expressão de STAT-1, IRF-1, STAT-3, Smad2 e Smad3 em células BeWo e HeLa tratadas com rIFN- γ , rIL-10 ou rTGF- β 1

Numa primeira etapa de experimentos, células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 1×10^6 células a cada 1ml de meio. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços e permaneceram por 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram estimuladas como a seguir: (i) infectadas por *T. gondii* (cepa RH, 5:1) por 1, 6 e 24 horas; ou (ii) tratadas com rIFN- γ (20ng/ml) por 1, 6 e 24 horas; ou ainda (iii) tratadas com rIFN- γ (20ng/ml) e infectadas por *T. gondii* (cepa RH, 5:1) por 1, 6 e 24 horas. Como controle, as células não foram infectadas e nem tratadas. Os tempos de incubação (1, 6 e 24 horas) foram baseados em estudos prévios (Choi et al., 2007). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Numa segunda etapa de experimentos, células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas, homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 1×10^6 células a cada 1ml de meio. Depois, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços e permaneceram por 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram estimuladas como a seguir: (i) infectadas por *T. gondii* (cepa RH, 5:1) por 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas; ou (ii) tratadas com rIL-10 ou rTGF- β 1 (ambas a 50ng/ml) por 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas; ou ainda (iii) tratadas com rIL-10 ou rTGF- β 1 (50ng/ml) e infectadas por *T. gondii* (cepa RH, 5:1) por 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas. Como controle, as células não foram infectadas e nem tratadas. Os tempos de incubação com rIL-10 ou rTGF- β 1 (30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas) foram baseados em estudos prévios (Finsterbusch et al., 2011;

Zhou et al., 2009), respectivamente. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As células provenientes das duas etapas experimentais foram lisadas em tampão de lise (50mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM de EDTA; 0,5% de Triton X100; 10% de glicerol; 1mM de dithiothreitol (DTT) e 200mM de NaCl) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (Complete®) mais 1mM de Na_3VO_4 e 1mM de NaF. Os lisados foram centrifugados a 13.000g por 15 minutos a 4°C, os sobrenadantes contendo proteínas totais foram coletados e submetidos à dosagem protéica pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Após o ajuste para 60 μg de proteínas totais, as amostras foram submetidas a Western blotting para observação da cinética de expressão de STAT-1, IRF-1, STAT-3, Smad2 e Smad3.

3.9. Western blotting para STAT-1, IRF-1, STAT-3, Smad2 e Smad3

Após o ajuste para 60 μg de proteínas, as amostras de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8% e 12%) sobre condições desnaturantes e transferidas para membranas de PVDF. As membranas contendo as proteínas totais foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação constante em tampão de blotting (25mM de Tris; 0,15M de NaCl e 0,1% de Tween 20, pH 7,4) contendo 4% de leite em pó. Após este período, as membranas foram incubadas por 12 horas a temperatura ambiente e sob agitação com os seguintes anticorpos primários: polyclonal de coelho anti-STAT-1 fosforilada humana (T^{701}) (1:1000, R&D Systems); monoclonal de camundongo anti-STAT-1 total humana (1:500, Invitrogen Life Technologies); polyclonal de coelho anti-IRF-1 humano (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); monoclonal de camundongo anti-STAT-3 fosforilada humana (S^{727}) (1:500, Santa Cruz Biotechnology); monoclonal de camundongo anti-STAT-3 total humana (1:500, R&D Systems); polyclonal de coelho anti-Smad2/3 fosforilada humana ($\text{S}^{465/467}$) (1:1000, Millipore); monoclonal de camundongo anti-Smad2/3

total humana (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); e monoclonal de camundongo anti- β -actina humana (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), todos diluídos em tampão de blotting com 2% de leite em pó. Depois, as membranas foram lavadas em tampão de blotting e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (anti-coelho-peroxidase ou anti-camundongo-peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories) na concentração de 1:3000 em tampão de blotting também a 2% de leite em pó durante 2 horas sob agitação e temperatura ambiente. A reação foi revelada em câmara escura usando kit de quimioluminescência (ECL kit) e as quantidades iguais de proteínas foram confirmadas por coloração de Pounceau (1%). A densitometria foi realizada usando o programa “KODAK software” (1D Image Analysis Software 3.5) com a finalidade de determinar a intensidade média das bandas. Os dados foram demonstrados como densidade relativa da razão entre as intensidades médias das bandas específicas de cada proteína e β -actina.

3.10. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade de células BeWo e HeLa frente aos tratamentos com Fludarabine (Sigma), inibidor de STAT-1, e WP1066 (Santa Cruz Biotechnology), inibidor de STAT-3, foi verificada usando o ensaio calorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 1×10^5 células a cada 200 μ l de meio. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e permaneceram por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações crescentes de Fludarabine ou WP1066 (0,1 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M) durante 24 horas em meio a 10% de soro. Após esse

período, os sobrenadantes foram removidos das placas e as células foram incubadas com 90 μ l de MTT (0,5mg/ml) acrescido de 10 μ l de meio a 10% de soro em estufa durante 4 horas. Depois, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan, produzidos pelas células viáveis que metabolizaram o MTT, foram solubilizados com 100 μ l de solução contendo SDS a 10% e N, N-dimetil formamida a 50%. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica (DO) foi obtida a 570nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) e os resultados foram expressos como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação aos controles (100%). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.11. Índice de proliferação de *T. gondii* (cepa 2F1) em células BeWo e HeLa tratadas com inibidores de STAT-1 e STAT-3

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura usando solução de tripsina-EDTA, centrifugadas a 400g por 5 minutos, homogeneizadas em meio a 10% de soro, contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma proporção de 2×10^4 células a cada 200 μ l de meio. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e permaneceram por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas com Fludarabine (0,1 μ M a 0,5 μ M) ou WP1066 (0,1 μ M a 2,5 μ M) em meio a 10% de soro por 2 horas e, em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* (cepa 2F1, 5:1) com meio a 2% de soro e incubadas por 3 horas em estufa. Após esse tempo, as células foram novamente tratadas com os inibidores (Fludarabine ou WP1066) nas mesmas concentrações acima descritas na presença ou ausência de rIFN- γ (20ng/ml) ou rIL-10 (50ng/ml), respectivamente, por adicionais 24 horas. Como controle, as células não foram tratadas com citocinas ou inibidores (meio) ou foram tratadas apenas com citocinas. Finalmente, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* através da

reação de β -galactosidade (Teo et al., 2007), conforme já descrito anteriormente. Os dados foram apresentados como índice de proliferação de *T. gondii* (β -Gal) de acordo com a referência da curva padrão (limite de detecção da reação de $15,625 \times 10^3$ parasitos totais). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.12. Análise estatística

Todos os dados foram analisados como média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e as comparações entre condições pares foram realizadas pelo teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. A proliferação de *T. gondii* é aumentada em células BeWo tratadas com rIL-10 e rTGF- β 1, enquanto rIFN- γ não é capaz de controlar a proliferação do parasito

Como anteriormente demonstrado, as citocinas anti-inflamatórias rIL-10 e rTGF- β 1 foram hábeis em promover aumento significante no índice de infecção (porcentagem de células infectadas) em células BeWo; enquanto que rIFN- γ , diferentemente de células HeLa, foi incapaz de controlar a invasão de *T. gondii* nas células BeWo. A modulação de ICAM-1 por estas citocinas em células BeWo e HeLa pode explicar, pelo menos parcialmente, a diferencial capacidade de invasão de *T. gondii* nestas duas diferentes linhagens celulares.

Agora, com o objetivo de verificar a influência dessas mesmas citocinas na proliferação intracelular de *T. gondii*, células BeWo e HeLa foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ dentro de placas de 96 poços, pré-tratadas com rTGF- β 1, rIL-10 ou rIFN- γ ,

infectadas ou não por *T. gondii* (2F1, 5:1) e novamente tratadas com as mesmas citocinas. Finalmente, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* através da reação de β -galactosidade.

Maior índice de proliferação de *T. gondii* foi observado em células BeWo tratadas com rIL-10 (média de 248.100 parasitos totais) ou rTGF- β 1 (média de 172.700 parasitos totais) em comparação com células infectadas e não tratadas (média de 92.070 parasitos totais) ($P<0,001$ e $P<0,05$, respectivamente) (Figura 1). No entanto, similar aos dados de índice de infecção, rIFN- γ não demonstrou nenhum efeito significante em controlar a proliferação do parasito em células BeWo (média de 79.060 parasitos totais) quando comparado às células infectadas e não tratadas (média de 92.070 parasitos totais) ($P>0,05$) (Figura 1). Células HeLa tratadas com rIL-10 apresentaram média de 161.200 parasitos totais ou, quando tratadas com rTGF- β 1, apresentaram média de 170.900 parasitos totais, sendo, portanto, incapazes de induzir aumento no índice de proliferação de *T. gondii* em relação às células infectadas e não tratadas (média de 175.400 parasitos totais) (Figura 1). Entretanto, de maneira diferente ao observado em células BeWo, rIFN- γ promoveu controle no índice de proliferação de *T. gondii* em células HeLa (média de 95.890 parasitos totais) quando comparado às células infectadas e não tratadas (média de 175.400 parasitos totais) ($P<0,05$) (Figura 1).

Com relação ao índice de proliferação de *T. gondii* na ausência de qualquer estímulo com citocinas, células HeLa apresentaram maior susceptibilidade à replicação do parasito intracelularmente se comparado às células BeWo (médias de 175.400 e 92.070 parasitos totais, respectivamente) ($P<0,05$) (Figura 1).

4.2. Produção diferenciada de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-β1) e pró-inflamatórias (MIF e IL-6) em células BeWo e HeLa

Com a finalidade de compreender os reais mecanismos operados por células BeWo e HeLa que poderiam ser responsáveis pela susceptibilidade diferencial destas células à infecção por *T. gondii*, uma diversidade de citocinas foram quantificadas no sobrenadante dessas células quando estimuladas ou não por rIL-10, rTGF-β1 e rIFN-γ. Para este propósito, células BeWo e HeLa foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ dentro de placas de 96 poços, pré-tratadas com rTGF-β1, rIL-10 ou rIFN-γ, infectadas ou não por *T. gondii* (cepa RH, 5:1) e novamente tratadas com as mesmas citocinas. Finalmente, o sobrenadante foi coletado para posterior dosagem de citocinas por ELISA (IL-10, TGF-β1 e MIF) ou por citometria de fluxo (Kit Th1/Th2/IL-17A: IL-6, IL-17A, IL-4, IL-2, IFN-γ, IL-10 e TNF-α).

Células BeWo e HeLa produziram IL-10 e especialmente TGF-β1 na presença ou ausência de infecção, porém maior produção de TGF-β1 foi observada em células BeWo infectadas e maior produção de IL-10 foi detectada em células HeLa infectadas em comparação com as respectivas células na ausência de infecção ($P<0,05$) (Figura 2A-B). Além disso, células HeLa diminuíram significativamente a produção de TGF-β1 quando infectadas por *T. gondii* em relação às células não infectadas ($P<0,05$) (Figura 2B). Com relação à produção de IFN-γ, nenhuma das linhagens celulares produziu concentrações detectáveis da citocina (dados não mostrados).

No que se refere à produção de MIF, células BeWo apresentaram níveis aumentados desta citocina apenas quando tratadas com rIFN-γ, independentemente da presença de *T. gondii* (60492pg/ml e 6369pg/ml, respectivamente), se comparado às células não tratadas e não infectadas (3193pg/ml) (ambos $P<0,001$) (Figura 3). Entretanto, células HeLa apresentaram níveis aumentados de MIF em diferentes condições: quando não tratadas e infectadas por *T. gondii* (5574pg/ml), tratadas com rIL-10 e infectadas (68780g/ml), e tratadas

com rIFN- γ na ausência ou presença de infecção (5202pg/ml e 7882pg/ml, respectivamente) quando comparado às células não tratadas e não infectadas (2844pg/ml) ($P<0,05$) (Figura 3). E, quando comparamos as duas linhagens celulares, células HeLa demonstraram maior produção de MIF em relação às células BeWo na maioria das condições experimentais ($P<0,05$), exceto na ausência de qualquer estímulo (controle) (Figura 3).

Os dados de citometria de fluxo para IL-6 demonstraram que células BeWo aumentaram consideravelmente a produção desta citocina na presença de *T. gondii* (4103pg/ml) em comparação com células não infectadas e não tratadas (1790pg/ml) ($P<0,001$) (Figura 4A). Quando células BeWo não infectadas foram tratadas com rIL-10 ou rTGF- β 1, houve diminuição na produção de IL-6 (1530pg/ml e 944,6pg/ml, respectivamente) em relação às células não tratadas e não infectadas (1790pg/ml) ($P<0,05$ e $P<0,001$) (Figura 4A). Similarmente aos resultados de células BeWo não infectadas e tratadas, células BeWo infectadas e tratadas com rIL-10 ou rTGF- β 1 diminuíram a produção de IL-6 (3644pg/ml e 1609pg/ml, respectivamente) quando comparado às células infectadas e não tratadas (4103pg/ml) ($P<0,05$) (Figura 4A). Finalmente, o tratamento de células BeWo com rIFN- γ induziu maior produção de IL-6 (3770pg/ml) em relação às células não tratadas e não infectadas (1790pg/ml) ($P<0,001$), embora esta produção ativada por rIFN- γ tenha reduzido em células infectadas (3439pg/ml) se comparado às células infectadas e não tratadas (4103pg/ml) ($P<0,05$) (Figura 4A).

Para as células HeLa, os dados de citometria de fluxo demonstraram que a produção de IL-6 aumentou quando estas células foram apenas infectadas (454pg/ml), ou infectadas e tratadas com rIL-10 (381,5pg/ml), rTGF- β 1 (368,7pg/ml) ou rIFN- γ (368,6pg/ml), ou ainda tratadas com rIFN- γ e não infectadas (120pg/ml), em comparação com células não tratadas e não infectadas (53,8pg/ml) ($P<0,001$) (Figura 4B). Células HeLa não infectadas e tratadas com rTGF- β 1 diminuíram a produção de IL-6 (22,3pg/ml) em relação às células não tratadas

e não infectadas (53,8pg/ml) ($P<0,001$) (Figura 4B). A produção de IL-6 ativada em células HeLa infectadas e tratadas com rIL-10, rTGF- β 1 ou rIFN- γ foi menor em comparação às células infectadas e não tratadas ($P<0,05$) (Figura 4B).

Quando comparamos as duas linhagens celulares, células BeWo demonstraram maior produção de IL-6 em relação às células HeLa em todas as condições experimentais (Figura 4A-B). Com relação às dosagens por citometria de fluxo de IL-4, IL-2, IFN- γ , IL-17A, IL-10 e TNF- α nos sobrenadantes das células BeWo e HeLa, os valores obtidos apresentaram-se abaixo dos limites de detecção para todas as citocinas (dados não mostrados).

4.3. Células BeWo tratadas com rIFN- γ apresentam fosforilação reduzida de STAT-1 e baixa expressão de IRF-1

Foi mostrado anteriormente que células BeWo, diferentemente de células HeLa, não foram capazes de controlar a invasão e a proliferação intracelular de *T. gondii* mediante estímulo com rIFN- γ . No intuito de verificar a via de sinalização intracelular ativada por IFN- γ em células BeWo e HeLa que pudesse refletir o efeito diferencial exercido por IFN- γ no parasitismo destas células, as mesmas foram cultivadas em placas de 6 poços em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas, as células foram tratadas com rIFN- γ , ou infectadas por *T. gondii* e tratadas com rIFN- γ , ou somente infectadas por *T. gondii*, ou ainda não estimuladas (controle) durante 1, 6 e 24 horas. Posteriormente, as células foram lisadas e as proteínas totais submetidas a Western blotting para detecção das formas totais e fosforiladas de STAT-1 bem como expressão de IRF-1.

A expressão de STAT-1 total pôde ser observada em todas as condições experimentais, inclusive em células BeWo e HeLa não tratadas e não infectadas, embora esta expressão tenha sido aumentada em ambas as células infectadas e tratadas com rIFN- γ (Figura 5A-B). *T. gondii* não induziu à fosforilação de STAT-1 em nenhuma linhagem celular (Figura

5A-C). rIFN- γ induziu à fosforilação de STAT-1 em células BeWo, porém esta fosforilação foi significante estatisticamente apenas quando as células BeWo foram tratadas com rIFN- γ e infectadas por *T. gondii* em comparação com células não tratadas e não infectadas ($P<0,001$) e também em relação às células apenas tratadas ($P<0,05$) (Figura 5A, C). Nas células HeLa, rIFN- γ apenas ou rIFN- γ mais *T. gondii* induziram a uma forte e significante fosforilação de STAT-1 quando comparado às células não tratadas (ambos $P<0,001$) (Figura 5B, C). Ao compararmos a fosforilação de STAT-1 entre as duas linhagens celulares, foi possível observar que rIFN- γ induziu a uma reduzida fosforilação de STAT-1 em células BeWo se comparada à forte fosforilação de STAT-1 detectada nas células HeLa ($P<0,05$) (Figura 5C). Além disso, os diferentes horários de estímulo com rIFN- γ (1, 6 e 24 horas) não apresentaram diferenças estatísticas na expressão de STAT-1 fosforilada (Figura 5C).

A expressão de IRF-1 foi elevada em células BeWo e HeLa após tratamento com rIFN- γ por 1, 6 e 24 horas quando comparado às células não tratadas ($P<0,05$) (Figura 6A-C). No entanto, maior expressão de IRF-1 após tratamento com rIFN- γ e infecção por *T. gondii* por 1, 6 e 24 horas foi apenas observada em células HeLa se comparado às células não tratadas e não infectadas ($P<0,05$) (Figura 6B, C). O tratamento com rIFN- γ e infecção por *T. gondii* por 1 hora induziu apenas a um leve aumento na expressão de IRF-1 em células BeWo em comparação às células não tratadas e não infectadas ($P<0,05$) (Figura 6A, C). *T. gondii* não foi capaz de aumentar a expressão de IRF-1 em nenhuma linhagem celular (Figura 6A-C). Ao compararmos a expressão de IRF-1 entre as duas linhagens celulares, foi observado que células HeLa apresentaram maior expressão de IRF-1 em relação às células BeWo em todas as condições experimentais ($P<0,05$) (Figura 6C).

4.4. Em células BeWo, rIL-10 induz fosforilação de STAT-3, mas rTGF-β1 não é capaz de induzir fosforilação de Smad2 e Smad3

Foi mostrado anteriormente que células BeWo, diferentemente de células HeLa, foram mais susceptíveis à proliferação de *T. gondii* na presença de exógenos de rIL-10 e rTGF-β1. Com a finalidade de explicar os efeitos diferenciais exercidos por IL-10 e TGF-β1 na susceptibilidade de células BeWo e HeLa ao parasito, nós investigamos as vias de sinalização ativadas por estas citocinas em ambas linhagens celulares. Para isso, as células foram cultivadas em placas de 6 poços em estufa a 37°C e 5% de CO₂, tratadas com rIL-10 ou rTGF-β1, ou infectadas por *T. gondii* e tratadas com rIL-10 ou rTGF-β1, ou somente infectadas por *T. gondii*, ou ainda não estimuladas (controle) durante 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas. Posteriormente, as células foram lisadas e as proteínas totais submetidas a Western blotting para detecção das formas totais e fosforiladas de STAT-3 e Smad2/3.

Os resultados obtidos do Western blotting mostraram uma fraca expressão para STAT-3 total e fosforilada em células BeWo, independentemente dos tempos de incubação com rIL-10 e *T. gondii* (dados não mostrados). No entanto, nenhuma fosforilação visível de STAT-3 foi observada em células HeLa tratadas com rIL-10 e/ou infectadas por *T. gondii* (dados não mostrados). Além disso, células BeWo e HeLa não apresentaram fosforilação de Smad2 ou Smad3, apesar de mostrarem forte expressão das formas totais destas proteínas de sinalização, de maneira independente dos tempos de incubação com rTGF-β1 (dados não mostrados).

4.5. A regulação da proliferação intracelular de *T. gondii* induzida por rIFN-γ e rIL-10 é dependente de STAT-1 e STAT-3, respectivamente

Para confirmar o efeito da fosforilação de STAT-1 e STAT-3 induzida por rIL-10 e rIFN-γ na regulação da susceptibilidade de células BeWo e HeLa à proliferação de *T. gondii*, as células foram primeiramente tratadas com concentrações crescentes (0,1μM, 0,25μM,

0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M) dos inibidores de STAT-1 (Fludarabine) e STAT-3 (WP1066) para verificar a viabilidade celular e determinar as concentrações de inibidores não tóxicas para as células.

Viabilidades celulares diferentes usando Fludarabine foram observadas em células BeWo e HeLa. Fludarabine causou menor citotoxicidade às células BeWo se comparado às células HeLa (Figura 7A, C). A viabilidade celular começou a diminuir em células HeLa a partir da concentração de 0,25 μ M de Fludarabine ($P<0,001$), enquanto que a viabilidade celular em células BeWo apresentou decréscimo apenas a partir de 5 μ M de Fludarabine, se comparada às condições sem inibidor (meio) ($P<0,01$) (Figura 7A, C). Viabilidades celulares semelhantes foram observadas em células BeWo e HeLa tratadas com WP1066. Ambas as células apresentaram viabilidade celular reduzida a partir de 10 μ M em comparação às células não tratadas ($P<0,05$) (Figura 7B, D). Com a obtenção desses dados, as concentrações de 0,1 μ M a 0,5 μ M e 0,1 μ M a 2,5 μ M foram adotadas para Fludarabine e WP1066, respectivamente.

Após determinar as concentrações de inibidores a serem utilizadas, células BeWo e HeLa foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ dentro de placas de 96 poços, pré-tratadas ou não com Fludarabine (0,1 μ M a 0,5 μ M) ou WP1066 (0,1 μ M a 2,5 μ M), infectadas por *T. gondii* (2F1, 5:1) e tratadas ou não com rIFN- γ ou rIL-10 na presença ou ausência de Fludarabine e WP1066, respectivamente. Finalmente, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* através da reação de β -galactosidade.

Conforme já mostrado anteriormente, células BeWo não controlaram a proliferação de *T. gondii* quando tratadas com rIFN- γ em relação às células não tratadas (Figura 8A). No entanto, células BeWo aumentaram o índice de proliferação de *T. gondii* quando tratadas com Fludarabine a 0,1 μ M em comparação com células não tratadas ($P<0,05$), ou quando estimuladas com rIFN- γ mais Fludarabine (0,1 μ M e 0,25 μ M) em relação às células tratadas

com rIFN- γ ($P<0,05$) (Figura 8A). Em contrapartida, células HeLa reduziram a proliferação de *T. gondii* quando tratadas com rIFN- γ se comparado às células não tratadas ($P<0,001$) (Figura 8C). Além disso, quase todas as concentrações de Fludarabine foram capazes de aumentar o índice de proliferação do parasito em células HeLa na presença ou ausência de estímulo com rIFN- γ , em comparação com células não tratadas ($P<0,001$) ou tratadas com rIFN- γ ($P<0,05$) (Figura 8C).

Células BeWo aumentaram o índice de proliferação de *T. gondii* quando tratadas com rIL-10 se comparado às células não tratadas ($P<0,001$) (Figura 8B). No entanto, a proliferação do parasito diminuiu consideravelmente em células BeWo tratadas com todas as concentrações de WP1066, na presença ou ausência de estímulo com rIL-10, em comparação às células não tratadas ($P<0,05$) ou tratadas com rIL-10 ($P<0,05$) (Figura 8B). Nas células HeLa, rIL-10 não induziu aumento no índice de proliferação de *T. gondii* quando comparado às células não tratadas (Figura 8D). Porém, as concentrações de 1 μ M e 2,5 μ M de WP1066 reduziram a proliferação do parasito em células HeLa se comparado às células não tratadas ($P<0,05$); enquanto que as concentrações de WP1066 a partir de 0,5 μ M junto ao estímulo de rIL-10 também diminuíram o índice de proliferação de *T. gondii* em relação às células HeLa tratadas apenas com rIL-10 ($P<0,05$) (Figura 8D).

5. DISCUSSÃO

No segundo capítulo deste estudo, foi investigado o papel de IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ na proliferação intracelular de *T. gondii* e o efeito das vias intracelulares ativadas por essas citocinas nesta proliferação. Células BeWo apresentaram maior índice de proliferação de *T. gondii* quando tratadas com IL-10 e TGF- β 1, enquanto que IFN- γ não foi capaz de controlar a proliferação do parasito nestas células. Por outro lado, IL-10 e TGF- β 1 não proporcionaram

aumento do índice de proliferação de *T. gondii* em células HeLa, entretanto IFN- γ foi capaz de controlar o mesmo índice nestas células. Estes resultados confirmam estudos prévios do nosso grupo (Barbosa et al., 2008).

IFN- γ já mostrou ser incapaz de controlar a infecção por *T. gondii* em células BeWo (Barbosa et al., 2008; Oliveira et al., 2006), embora esta citocina tenha controlado a replicação de *N. caninum*, parasito altamente semelhante a *T. gondii*, em células BeWo (Carvalho et al., 2010). IFN- γ é capaz de ativar diversos mecanismos efetores intracelulares que controlam a infecção por *T. gondii*, como por exemplo a indução de IDO, que é ativada em células HeLa e não está presente em células trofoblásticas BeWo (Carvalho et al., 2010; Entrican et al., 2002; Oliveira et al., 2006). No entanto, outros mecanismos efetores induzidos por IFN- γ podem participar do controle do parasitismo em células HeLa e mostrarem-se ausentes em células BeWo, tornando-as incapazes de combater o parasitismo mesmo quando tratadas com estas citocinas. Além disso, alguns mecanismos efetores induzidos por IL-10 e TGF- β 1 também podem estar operando em células BeWo, favorecendo sua maior susceptibilidade à infecção por *T. gondii*, o que efetivamente não estaria ocorrendo em células HeLa tratadas com estas citocinas. Assim, conhecer as vias intracelulares ativadas por essas citocinas, bem como o papel dessas citocinas na regulação da secreção de outras citocinas, poderiam esclarecer alguns dos mecanismos operantes em células BeWo e HeLa que seriam responsáveis pelas susceptibilidades diferenciadas destas células à infecção.

Após observar o efeito de IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ no índice de proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HeLa, nós mensuramos a concentração de algumas citocinas no sobrenadante destas células.

Células BeWo e HeLa não infectadas produziram similares quantidades de IL-10 e TGF- β 1. Quando infectadas, células BeWo aumentaram apenas a produção de TGF- β 1, enquanto células HeLa aumentaram apenas a liberação de IL-10. Provavelmente, a maior

produção de IL-10 por células HeLa não seja suficiente para aumentar o índice de proliferação de *T. gondii* nestas células, mas é eficaz em induzir o aumento do índice de infecção, como observado anteriormente no capítulo I. Adicionalmente, maiores concentrações de IL-10 em células HeLa infectadas não necessariamente ativa um perfil anti-inflamatório nestas células. Macrófagos humanos pré-tratados com IFN- γ foram refratários aos efeitos de IL-10 (Herrero et al., 2003). Macrófagos pré-estimulados com IFN- γ e tratados com IL-10 foram incapazes de reduzir a produção de mediadores inflamatórios induzido por IFN- γ , como TNF, IL-1 e IL-8. Além do mais, IL-10 induziu à fosforilação de STAT-1, e não de STAT-3, em macrófagos pré-tratados com IFN- γ , demonstrando um papel pró-inflamatório de IL-10 em células tratadas com IFN- γ (Herrero et al., 2003). Além disso, nossos estudos prévios mostraram que células HeLa tratadas simultaneamente com IFN- γ e IL-10 continuaram sendo capazes de controlar ambos índices de infecção e proliferação de *T. gondii* (Barbosa et al., 2008). Assim, é possível especular que IL-10, quando adicionada concomitante a um estímulo pró-inflamatório como IFN- γ ou o próprio parasito *T. gondii*, possa exercer efeitos pró-inflamatórios e, consequentemente, não regular genes imunossupressores.

Células BeWo produziram altas concentrações de TGF- β 1, sugerindo que os altos índices de proliferação e infecção por *T. gondii* nestas células está relacionada aos níveis aumentados desta citocina. Altas concentrações de TGF- β 1 também foram detectadas em células BeWo infectadas por *N. caninum*, embora nenhuma produção de IL-10 tenha sido observada nestas células infectadas (Carvalho et al., 2010). Adicionalmente, *T. gondii* mostrou influenciar na expressão de RNAm para TGF- β e aumentou a secreção das isoformas 1 e 2 desta citocina em células epiteliais pigmentares da retina humana, tornando o ambiente favorável à proliferação do parasito (Nagineni et al., 2002).

Ao verificarmos a produção de MIF, células BeWo aumentaram a secreção de MIF apenas quando tratadas com IFN- γ . Este resultado está de acordo com estudos prévios do nosso grupo, que demonstraram maior produção de MIF induzida por IFN- γ em vilos coriônicos humanos (Ferro et al., 2008; Gomes et al., 2011). De uma maneira geral, células HeLa produziram maiores concentrações de MIF se comparado às células BeWo, mesmo na presença de tratamento com IFN- γ . A menor produção de MIF por células BeWo em relação às células HeLa pode estar relacionada com a maior susceptibilidade de células BeWo à infecção por *T. gondii*, já que MIF é uma citocina importante no controle do parasitismo (Cavalcanti et al., 2011; Flores et al., 2008; Gomes et al., 2011; Terrazas et al., 2010).

Camundongos MIF $^{/-}$ são mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* quando infectados pelas cepas ME49 ou RH em relação aos animais selvagens (Flores et al., 2008). A maior susceptibilidade dos animais MIF $^{/-}$ ao parasito foi consequência da reduzida produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-18 pelas células dendríticas desses animais (Flores et al., 2008). Além disso, células dendríticas derivadas de camundongos MIF $^{/-}$ diminuíram显著mente a sua propriedade de maturação por expressar baixos níveis de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40, prejudicando a resposta imune inata contra *T. gondii* (Terrazas et al., 2010). Estes dados sugerem que MIF age na regulação da função de células do sistema imune inato em animais infectados por *T. gondii* (Flores et al., 2008; Terrazas et al., 2010), evidenciando o efeito protetor de MIF contra *T. gondii*. De maneira semelhante, Cavalcanti e colaboradores (2011) observaram o importante papel de MIF no controle de *T. gondii* no intestino de camundongos infectados, uma vez que MIF induziu à produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IL-23. Adicionalmente, nossos estudos prévios verificaram que MIF foi importante no controle da infecção por *T. gondii* em vilos placentários humanos de primeiro trimestre gestacional (Gomes et al., 2011) e em células BeWo infectadas por *T. gondii* e

tratadas com azitromicina (Franco et al., 2011). De acordo com os resultados aqui apresentados, células BeWo também produziram menores quantidades de MIF se comparado às células HeLa na presença de infecção por *N. caninum* (Carvalho et al., 2010). Todos estes dados reforçam o papel de MIF como citocina importante no controle da infecção por *T. gondii*. Possivelmente, células BeWo apresentaram-se mais susceptíveis à infecção na presença de IL-10 e TGF- β 1, ou não controlaram a infecção quando estimuladas por IFN- γ , porque produziram menores quantidades de MIF em relação às células HeLa.

Quando verificamos a produção de IL-6, células BeWo aumentaram a secreção da citocina quando infectadas e não tratadas e quando tratadas com IFN- γ . No entanto, em células BeWo tratadas com IL-10 ou TGF- β 1 e infectadas ou não pelo parasito, a produção de IL-6 caiu consideravelmente. O mesmo padrão de resposta para IL-6 foi observado em células HeLa, embora estas células produziram concentrações de IL-6 bem menores se comparado às células BeWo. IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que possui importante efeito contra a infecção por *T. gondii* (Halonen; Chiu; Weiss, 1998; Jebbari et al., 1998; Lyons et al., 2001). É possível que a regulação negativa de IL-6 por IL-10 e TGF- β 1 em células BeWo, juntamente à menor produção de MIF por estas células, possam agir conjuntamente para favorecer a susceptibilidade de células trofoblásticas BeWo à infecção por *T. gondii*. E, por outro lado, células HeLa, mesmo que tenham regulado negativamente IL-6 quando tratadas com IL-10 ou TGF- β 1, estas células produziram significantes quantidades de MIF nas mesmas condições experimentais, o que poderia anular o efeito da baixa quantidade de IL-6 e promover uma menor susceptibilidade ao parasitismo nestas células.

IL-6 possui importantes funções na interface materno-fetal, o que explica a sua grande quantidade detectada em células BeWo se comparado às células HeLa. Expressão de IL-6 já foi demonstrada no endométrio humano, especialmente nas células epiteliais e glândulas associadas (Tabibzadeh et al., 1995), na camada de sinciciotrofoblasto e trofoblasto

extraviloso (Jauniaux et al., 1996) e também no citotrofoblasto (Stephanou et al., 1995). A expressão de IL-6 na interface materno-fetal parece ser crucial para a migração e invasão do trofoblasto no endométrio, uma vez que demonstrou influenciar na secreção de metaloproteinases (Meisser et al., 1999). Trabalhos mais recentes relataram expressão de IL-6 e seu receptor específico em citotrofoblasto humano de primeiro trimestre gestacional e em células trofoblásticas extravilosas da linhagem HTR-8 (Jovanović; Vícovac, 2009). O estímulo destas populações celulares com exógenos de IL-6 aumentou o potencial migratório e invasivo destas células por proporcionar forte expressão das integrinas $\alpha 1$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ na suas respectivas membranas plasmáticas (Jovanović; Vícovac, 2009). Adicionalmente, a produção de IL-6 por células trofoblásticas extravilosas (HTR-8) induziu a uma forte fosforilação de STAT-3 dependente de IL-6, tornando esta via de sinalização importante no processo de migração dessas células (Mulla et al., 2010). A expressão de IL-6 também mostrou-se importante no processo de nutrição das próprias células trofoblásticas, uma vez que esta citocina, através da fosforilação de STAT-3, promoveu uma maior captura de aminoácidos pelo trofoblasto, já que induziu a uma forte expressão do transportador de membrana SNAT2 (Jones; Jansson; Powell, 2009). A produção de IL-6 por células BeWo também já foi observada em estudos anteriores (Fujisawa et al., 2000) e, além disso, IL-6 parece estar envolvida na indução da liberação de hormônios, como a gonadotrofina coriônica humana (β HCG), em células BeWo (Tsukihara et al., 2004) e em outros modelos de trofoblasto humano (Li et al., 1992). Coletivamente, todos esses dados apontam a importância de IL-6 na interface materno-fetal e justifica a sua abundância encontrada em células BeWo no presente estudo.

Apesar de IL-6 desempenhar funções importantes para o sucesso gestacional, a sua concentração deve ser equilibrada no microambiente uterino. Estudos demonstraram que altos níveis de IL-6 estão relacionados a apoptose de células trofoblásticas humanas, a ativação das

células endoteliais maternas, ao desencadeamento da pré-eclâmpsia (Chen et al., 2010) e ao desenvolvimento de inflamações no cório e âmnio (Lockwood et al., 2010). Assim, no presente estudo, o efeito de IL-10 e TGF- β 1 em reduzir a produção de IL-6 em células BeWo infectadas ou não por *T. gondii* pode representar um potencial mecanismo de modulação destas citocinas anti-inflamatórias sobre IL-6, garantindo sua concentração adequada e prevenindo possíveis danos às células trofoblásticas, mesmo que favoreça a infecção por *T. gondii*. Interessantemente, Halonen e colaboradores (1998) observaram que IL-6 foi incapaz de controlar a proliferação de *T. gondii* da cepa ME49 em astrócitos murinos, apesar desta citocina promover o controle do parasitismo sistemicamente (Jebbari et al., 1998). IL-6 impediu a produção de óxido nítrico em astrócitos murinos infectados por *T. gondii* e tratados com IFN- γ e IL-1 β , revertendo o efeito protetor de IFN- γ e IL-1 β na infecção pelo parasito (Halonen; Chiu; Weiss, 1998). Portanto, é possível especular que IL-6 possa exercer efeitos diferenciados de acordo com o tipo celular envolvido, bem como em diferentes microambientes. Para esclarecer esta hipótese, futuros experimentos são necessários para testar o efeito de IL-6 exógena sobre o parasitismo em células trofoblásticas BeWo em comparação com células HeLa.

Posteriormente, nós investigamos as vias de sinalização ativadas por IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ em células BeWo e HeLa através da detecção das formas totais e fosforiladas de STAT-3, Smad2/3 e STAT-1. Células BeWo apresentaram fraca expressão de STAT-3 (S⁷²⁷), enquanto células HeLa não demonstraram nenhuma expressão de STAT-3. Porém, nós não verificamos a fosforilação de STAT-3 nos seus resíduos de tirosina 705. Apesar da fraca expressão de STAT-3 fosforilada na posição S⁷²⁷ por células BeWo, ainda é possível supor que células BeWo tratadas com IL-10 possuem maiores índices de infecção e de proliferação intracelular de *T. gondii* pela ativação de STAT-3 dependente de IL-10 e, consequentemente, induzindo a expressão de genes anti-inflamatórios, diferentemente do observado em células

HeLa. A regulação de genes anti-inflamatórios mediados por IL-10 e STAT-3 já foi descrita previamente por alguns estudos. IL-10, através da fosforilação de STAT-3, mostrou impedir a degeneração de neurônios murinos por suprimir mediadores pró-inflamatórios (Sharma et al., 2011). Adicionalmente, IL-10 e STAT-3 controlaram a citotoxicidade de células natural killers deciduais da linhagem NK-92 (Braunschweig et al., 2011); e a fosforilação de STAT-3 também mostrou-se fundamental para a sobrevivência e proliferação de células trofoblásticas da linhagem JEG-3 (Oufkir; Vaillancourt, 2011). Entretanto, nós não verificamos fosforilação de STAT-3 induzida apenas por *T. gondii* em células BeWo ou HeLa, diferindo de estudos anteriores que demonstraram ativação de STAT-3 por *T. gondii* em macrófagos murinos de um modo independente de tratamento com IL-10 ou IL-6 (Butcher et al., 2005).

Nós não detectamos nenhuma fosforilação de Smad2/3 em células BeWo e HeLa tratadas com TGF- β 1, porém a forma total de Smad2/3 foi fortemente observada em tais células. Uma vez que o tratamento com TGF- β 1 induziu a altos índices de infecção e proliferação de *T. gondii* em células BeWo, é possível que estes efeitos sejam independentes de Smads.

Células BeWo apresentaram menor fosforilação de STAT-1 e menor expressão de IRF-1 se comparado às células HeLa. A ativação da via JAK-STAT-IRF-1 por IFN- γ é de extrema importância para o controle de infecções por diferentes patógenos (Saha et al., 2010), incluindo *T. gondii* (Silva et al., 2002). Camundongos nocautes para IFN- γ e IRF-1 mostraram-se extremamente susceptíveis à infecção por *T. gondii* devido a uma alta carga parasitária no cérebro, fígado, pulmão e baço destes animais, bem como a uma deficiência na expressão de IDO e na degradação do triptofano, aminoácido essencial para o crescimento do parasito (Silva et al., 2002). Assim, células BeWo, ao apresentarem menor ativação de STAT-1 e IRF-1, tornaram-se menos responsivas aos efeitos microbicidas induzidos por IFN- γ ; enquanto que células HeLa, possivelmente por apresentarem maior ativação desta via

intracelular, mostraram-se altamente resistentes à infecção por *T. gondii*. Estudos prévios já demonstraram que células trofoblásticas das linhagens Jar e JEG-3 apresentaram fracas fosforilações de JAK-1, JAK-2 e STAT-1 em relação às células HeLa, reduzindo consequentemente a regulação de genes pró-inflamatórios como IRF-1 e as subunidades proteassômicas LMP-2, LMP-7 e LMP-10 (Choi et al., 2007).

Para confirmar os efeitos das vias de sinalização ativadas por IL-10 e IFN- γ na proliferação intracelular de *T. gondii*, nós usamos inibidores específicos de STAT-3 e STAT-1. Demonstramos que a inibição de STAT-1 por Fludarabine aumentou o índice de proliferação de *T. gondii*, especialmente em células HeLa tratadas ou não por IFN- γ . Esse resultado sugere que a inibição da via intracelular ativada por IFN- γ impossibilitou a sua ação efetora contra a infecção por *T. gondii* em células HeLa. Apesar de células BeWo não controlarem a infecção por *T. gondii* frente a administração de IFN- γ , um efeito basal desta citocina ocorre nestas células, uma vez que a inibição de STAT-1 promoveu um significante aumento da proliferação do parasito nessa linhagem celular. Por outro lado, a inibição de STAT-3 por WP1066 reduziu consideravelmente a proliferação de *T. gondii*, principalmente em células BeWo tratadas ou não com IL-10. Assim, a inibição da via intracelular ativada por IL-10 impediu o efeito positivo desta citocina em aumentar a suscetibilidade de células BeWo à infecção. Mesmo que nós tenhamos mostrado anteriormente que células HeLa não mostraram aumento no índice de proliferação de *T. gondii* frente ao tratamento com IL-10, um efeito basal desta citocina pode ser observado nestas células, já que a inibição de STAT-3 junto com o tratamento de IL-10 reduziu a replicação do parasito em algumas condições. Portanto, é possível sugerir que a proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HeLa frente aos estímulos com IL-10 ou IFN- γ é modulada pelas vias intracelulares ativadas por estas citocinas.

IL-6 e IL-10 são citocinas com efeitos antagônicos, porém ambas induzem vias intracelulares dependentes de STAT-3 (Cheon et al., 2006; Donnelly et al., 1999; Mulla et al., 2010). É possível supor que IL-6 favoreça susceptibilidade à infecção quando administrada junto com IL-10, desde que IL-6 impediu a produção de óxido nítrico em astrócitos murinos infectados por *T. gondii*, ou seja, em um microambiente considerado imunologicamente privilegiado (Halonen; Chiu; Weiss, 1998). Talvez em células trofoblásticas, representantes de um sítio de imunoprivilégio, IL-6 também ative STAT-3 e favoreça o parasitismo em células trofoblásticas BeWo. Novos experimentos abordando estes parâmetros já estão sendo conduzidos.

Todos esses dados nos permitem sugerir que a maior ou menor susceptibilidade de células BeWo e HeLa à infecção por *T. gondii* frente aos estímulos com IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ é dependente de vias distintas de sinalização intracelular, bem como da produção diferenciada de fatores inflamatórios (MIF e IL-6) mediados por IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ .

FIGURAS

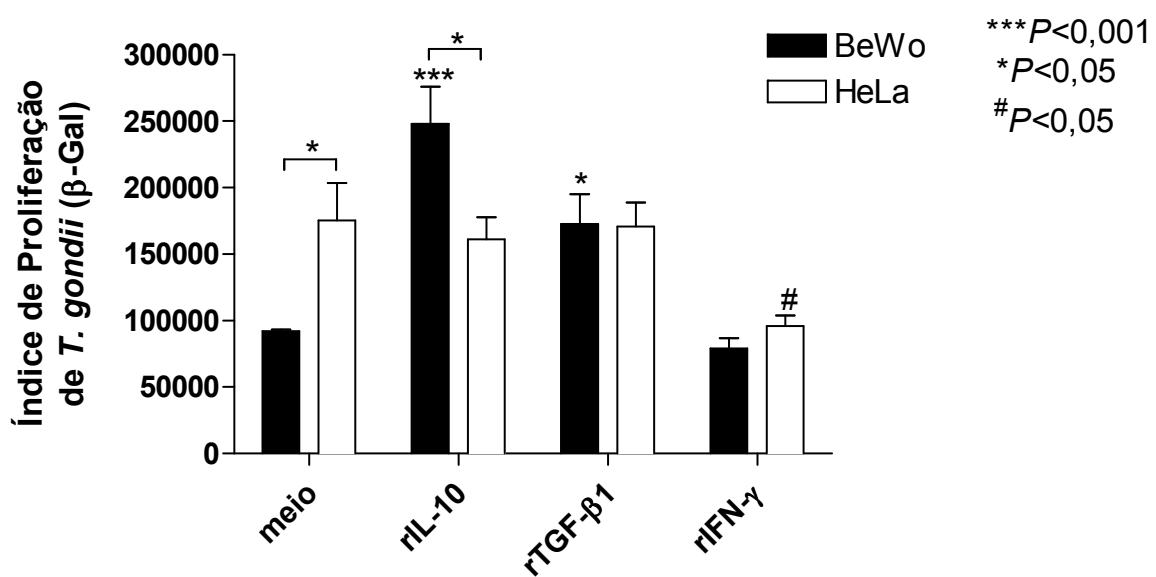
Figura 1

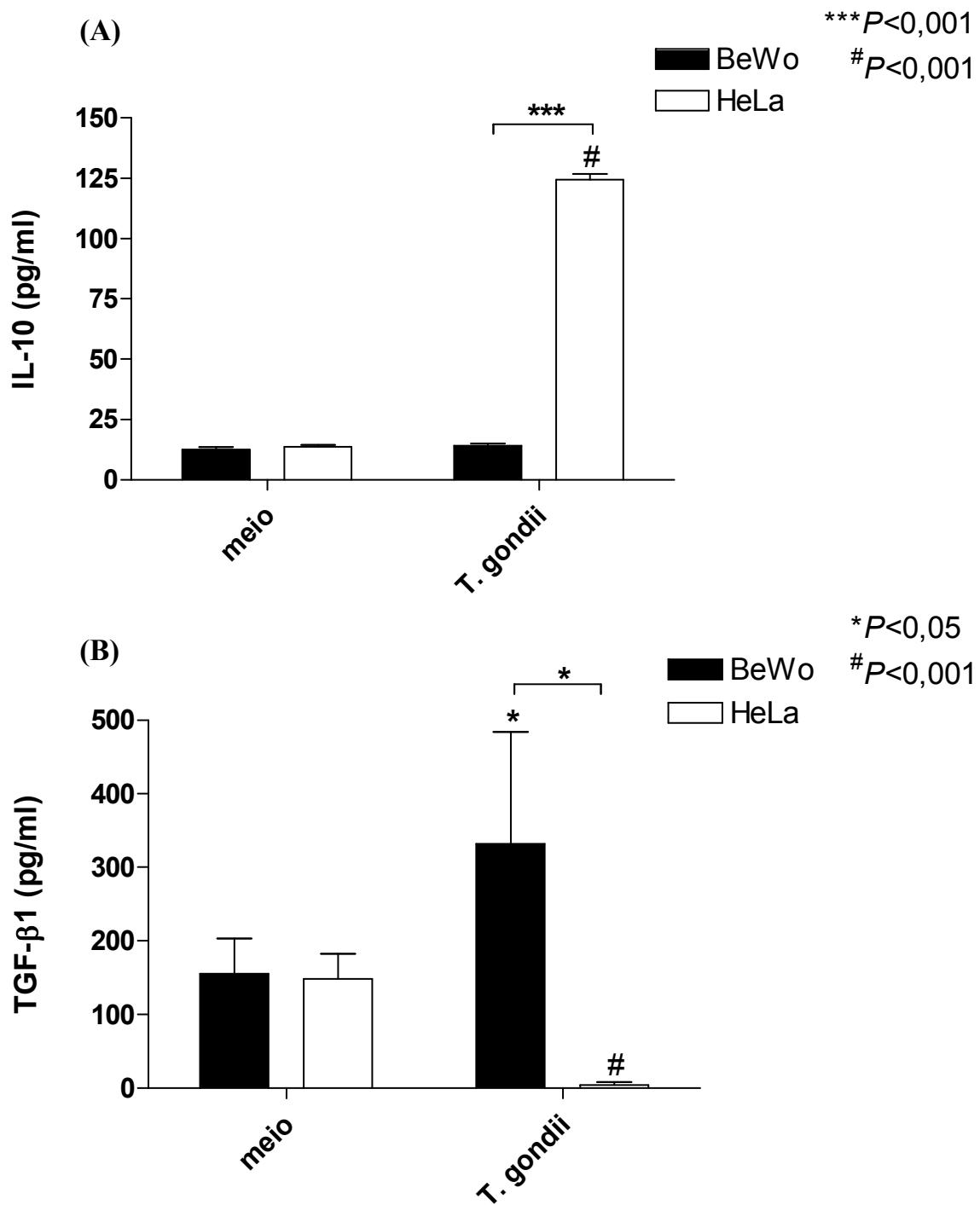
Figura 2

Figura 3

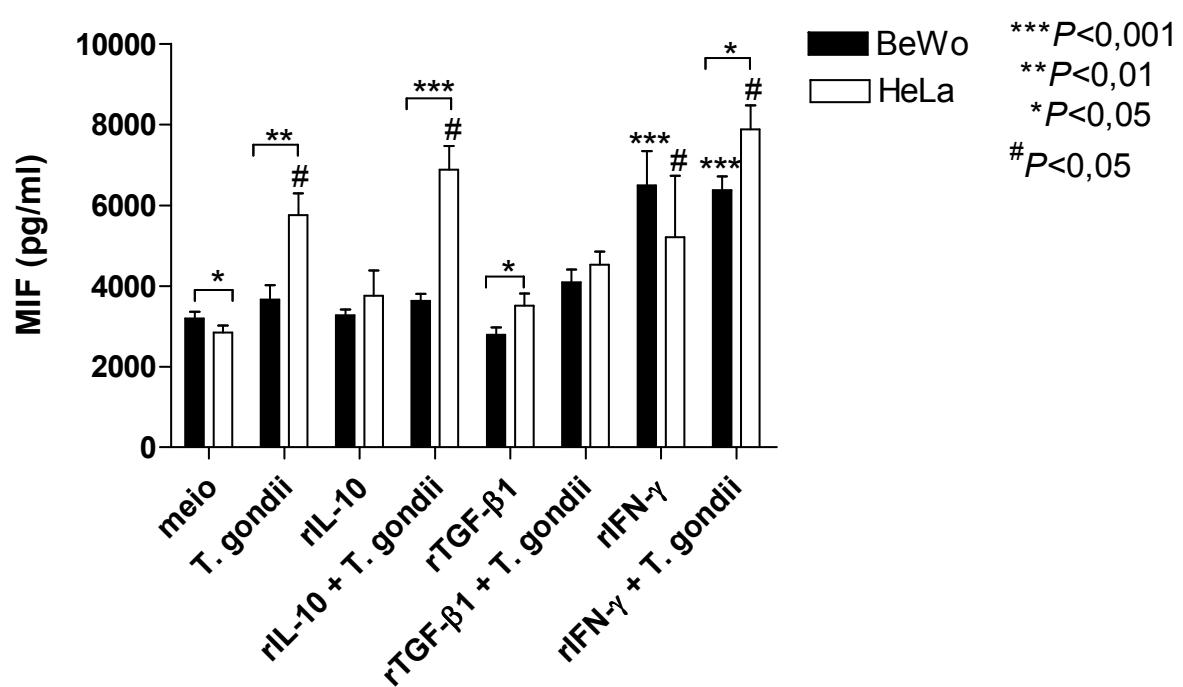


Figura 4

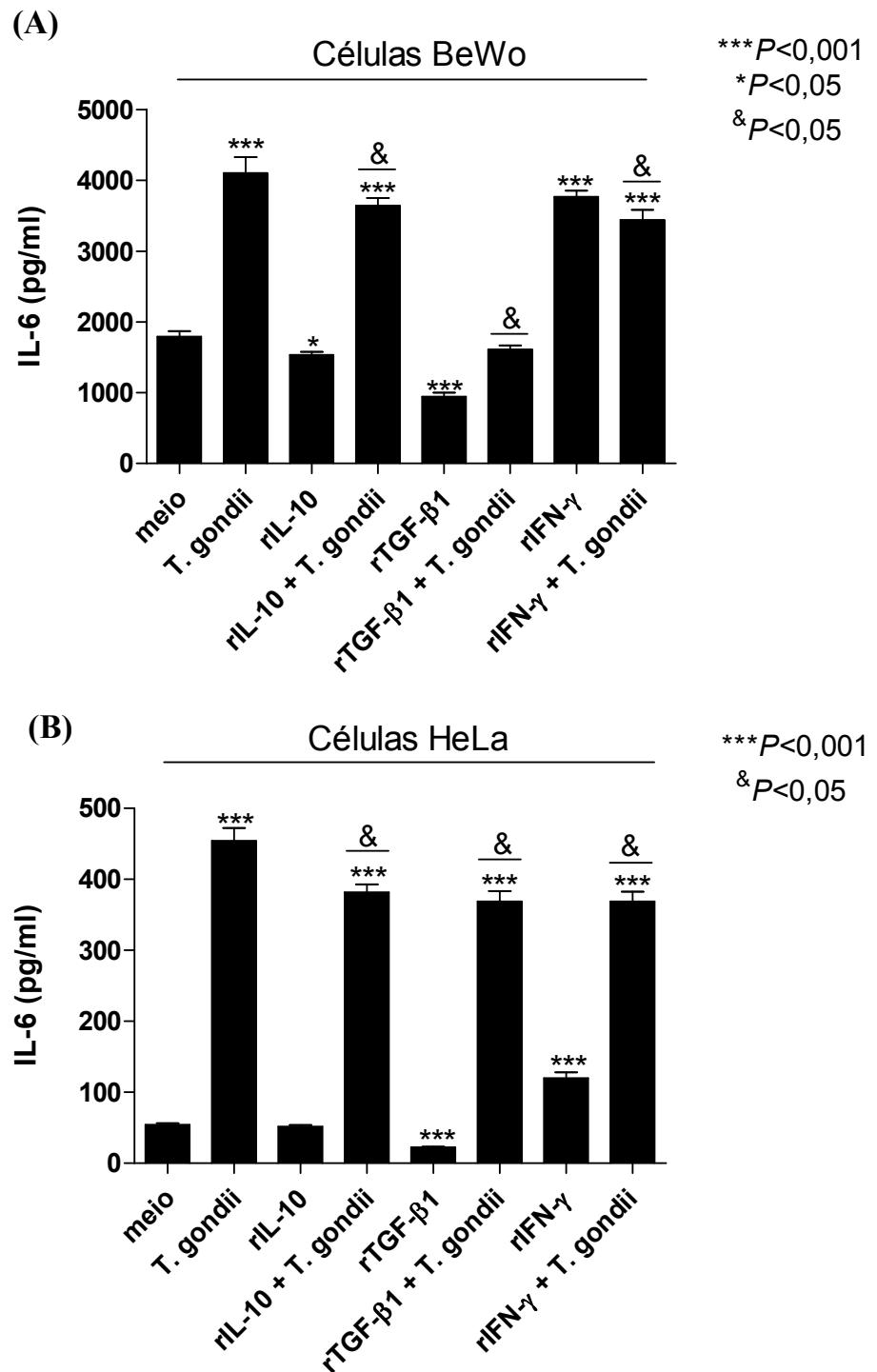


Figura 5

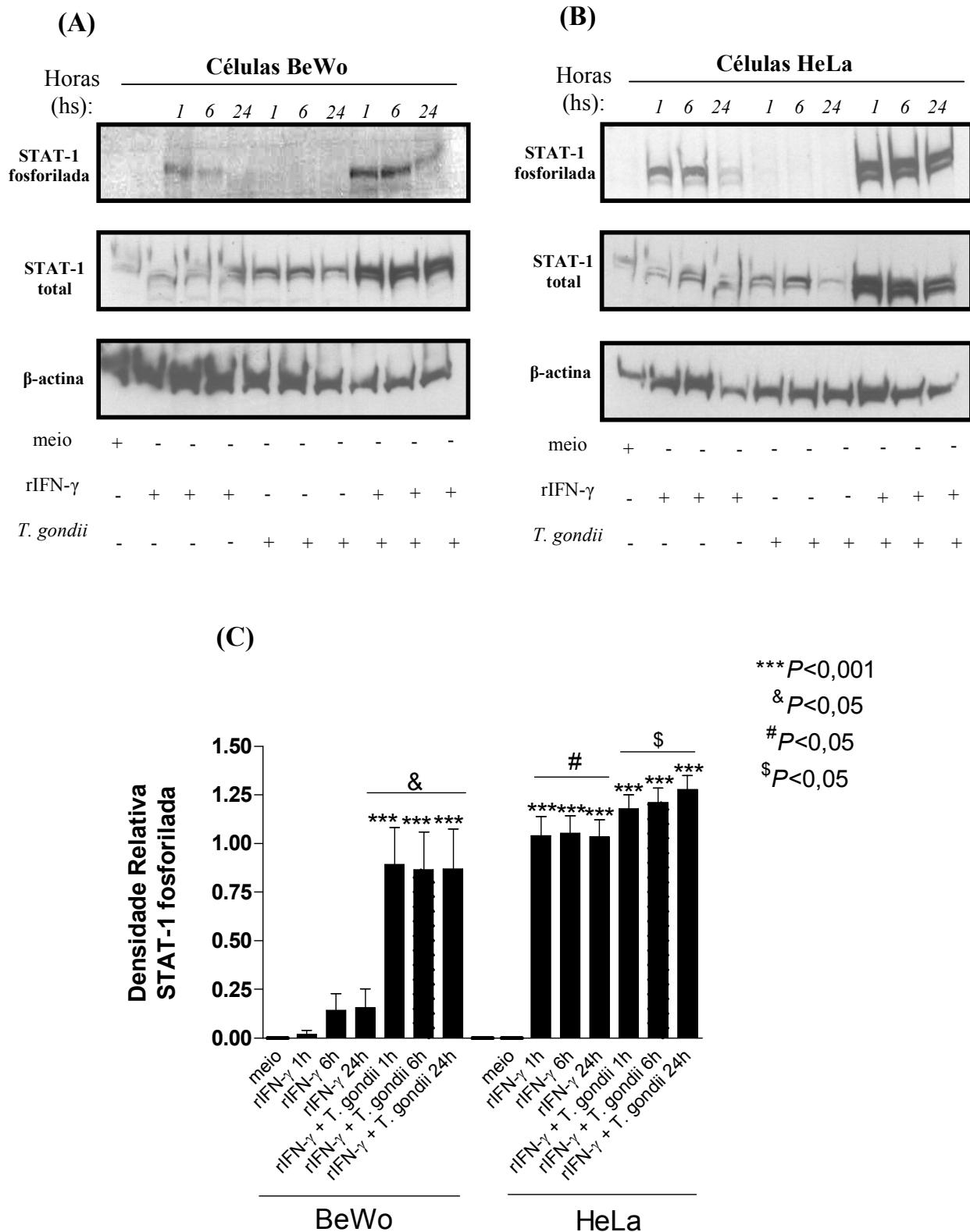


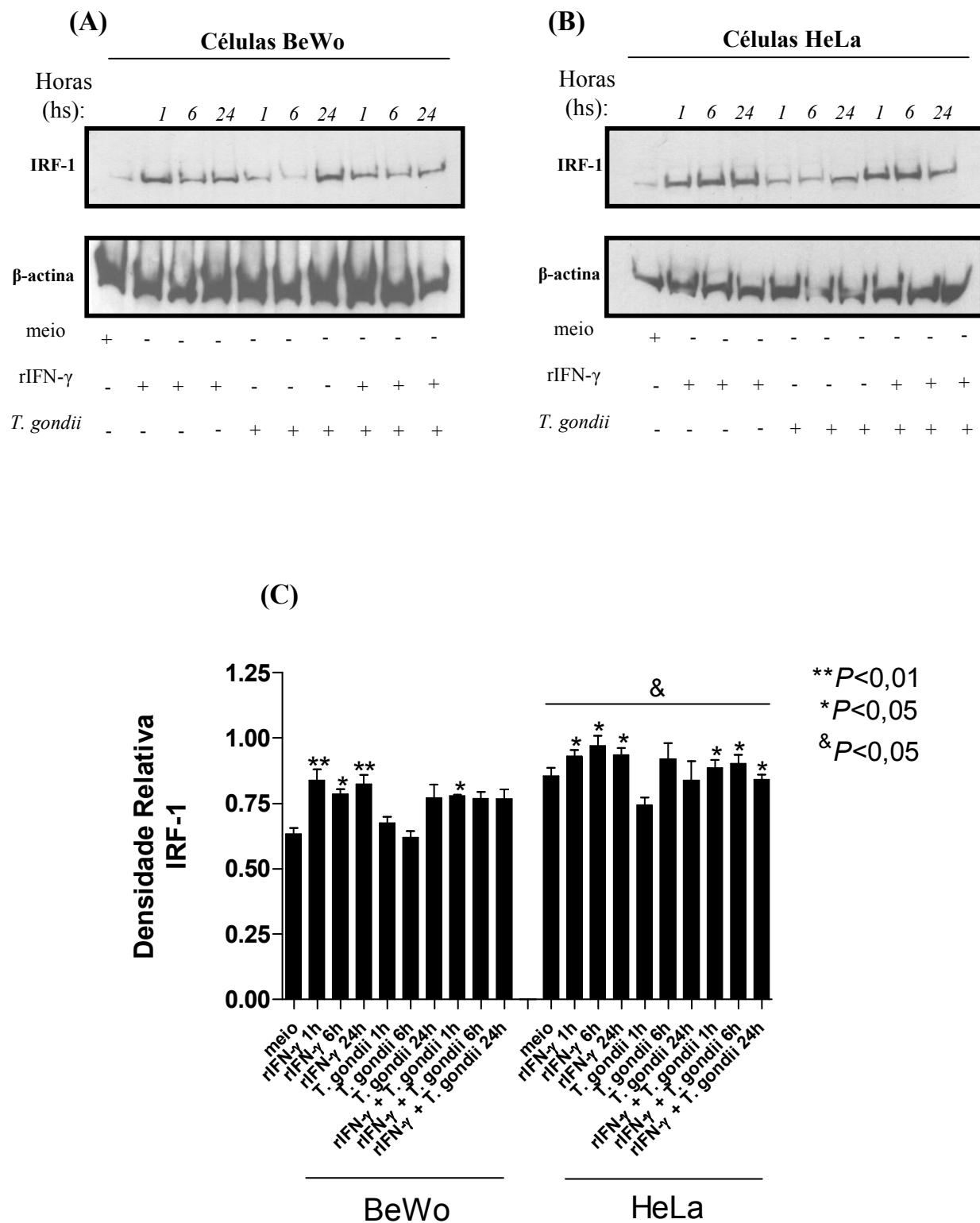
Figura 6

Figura 7

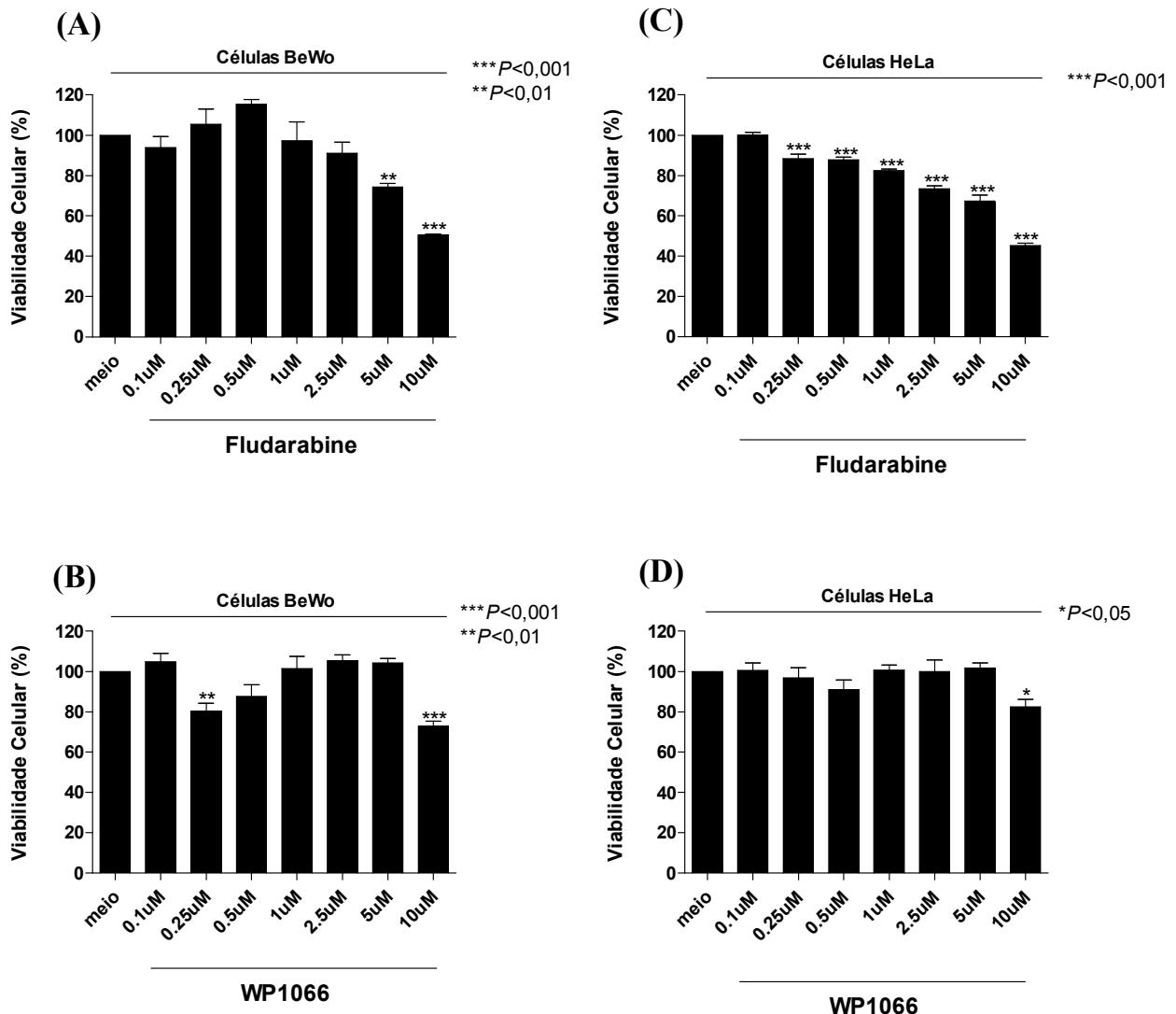
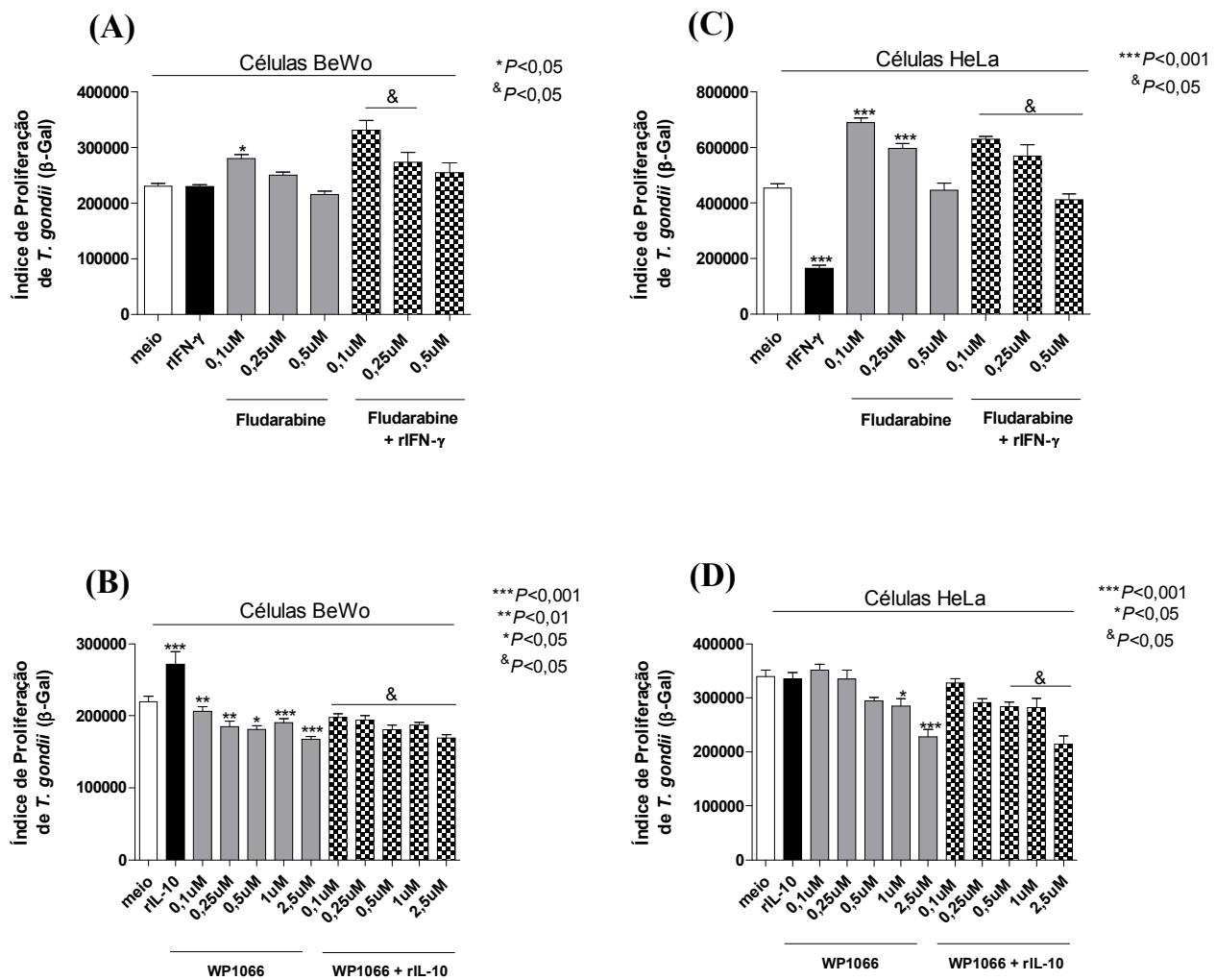


Figura 8



CONCLUSÕES GERAIS

A análise dos nossos dados apresentados tanto no Capítulo I, quanto no Capítulo II, nos permite concluir que:

- IL-10 e TGF- β 1 induzem o aumento do índice de infecção por *T. gondii* em células BeWo;
- IFN- γ controla o índice de infecção por *T. gondii* em células HeLa, mas não o faz em células BeWo;
- TGF- β 1 e IFN- γ induzem aumento da expressão de ICAM-1 em células BeWo;
- TGF- β 1 e IFN- γ promovem redução da expressão de ICAM-1 induzida por *T. gondii* em células HeLa;
- O aumento na expressão de ICAM-1 está associado ao aumento do índice de infecção por *T. gondii* em células BeWo e HeLa;
- ICAM-1 é uma molécula participante da interação parasito-hospedeiro por favorecer a adesão de *T. gondii* à membrana de células BeWo e HeLa;
- IL-10 e TGF- β 1 induzem o aumento do índice de proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo;
- IFN- γ controla a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HeLa, mas não o faz em células BeWo;
- Células BeWo produzem mais TGF- β 1 quando infectadas, e células HeLa secretam mais IL-10 quando infectadas;
- Células HeLa produzem maiores concentrações de MIF que células BeWo;
- IL-10 e TGF- β 1 reduzem a produção de IL-6 em células BeWo quando infectadas ou não por *T. gondii*;
- Maior fosforilação de STAT-3 é observada em células BeWo que em células HeLa;

- Menor fosforilação de STAT-1 e reduzida expressão de IRF-1 são observadas em células BeWo quando comparado às células HeLa;
- STAT-1 e STAT-3 participam efetivamente da regulação da infecção por *T. gondii* em células BeWo e HeLa.

De uma maneira geral, é possível concluir que IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ são citocinas que agem distintamente em células BeWo e HeLa, induzindo vias intracelulares diferentes e regulando diferentemente mecanismos efetores envolvidos na maior ou menor susceptibilidade destas células à infecção por *T. gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, E.; MATSUBARA, K.; OKA, K.; KUSANAGI, Y.; ITO, M. Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on trophoblasts in preeclampsia. **Gynecol Obstet Invest.**, Switzerland, v. 66, nº 1, p. 27-33, Jan., 2008.

ALIBERTI, J.; SERHAN, C.; SHER, A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. **J. Exp. Med.**, Bethesda, v. 196, nº 9, p. 1253-1262, Nov., 2002.

ANDO, N.; HIRAHARA, F.; FUZUSHIMA, J.; KAWAMOTO, S.; OKUDA, K.; FUNABASHI, T.; GORAI, I.; MINAGUCHI, H. Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Yokohama, v. 40, nº 1, p. 48-56, Jul., 1998.

BARBOSA, B. F; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clin. Exp. Immunol.**, England, v. 151, nº 3, p. 536-545, Mar., 2008.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell. Microbiol.**, St. Louis, v. 7, nº 4, p. 561-568, Apr., 2005.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor- β in Leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, Salvador, v. 257, nº 5096, p. 545-548, Jul., 1992.

BEIJAR, E. C.; MALLARD, C.; POWELL, T. L. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. **Placenta**, Sweden, v. 27, nº 2-3, p. 322-326, Feb-Mar., 2006.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon treated mouse macrophages. **Infect. Immun.**, Wurzburg, v. 31, n° 3, p. 1141-1145, Mar., 1993.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7, n° 72, p. 248-254, May., 1976.

BRAUNSCHWEIG, A.; POEHLMANN, T. G.; BUSCH, S.; SCHLEUSSNER, E.; MARKERT, U. R. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and suppressor of cytokine signaling (SOCS3) balance controls cytotoxicity and IL-10 expression in decidua-like natural killer cell line NK-92. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Jena, v. 66, n° 4, p. 329-335, Oct., 2011.

BULMER, J. N.; RASHEED, F. N.; FRANCIS, N.; MORRISON, L.; GREENWOOD, B. M. Placental malaria II. A semi-quantitative investigation of the pathological features. **Histopathology**, Newcastle, v. 22, n° 3, p. 219-225, Mar., 1993.

BUTCHER, B. A.; KIM, L.; PANAPOULOS, A. D.; WATOWICH, S. S.; MURRAY, P. J.; DENKERS, E. Y. Cutting Edge: IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages. **J. Immunol.**, Nova York, v. 174, n° 6, p. 3148-3152, Mar., 2005.

CARRUTHERS, V. B.; HAKANSSON, S.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infect. Immun.**, Missouri, v. 68, n° 7, p. 4005-4011, Jul., 2000.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.**, Baltimore, v. 81, n° 2, p. 111-122, Feb., 2002.

CARVALHO, J. V.; ALVES, C. M. O. S.; CARDOSO, M. R. D.; MOTA, C. M.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. **Int. J. Parasitol.**, Uberlândia, v. 40, nº 14, p. 1629-1637, Dec., 2010.

CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J. S.; MADI, K.; FEIJÓ, D. F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; SOUZA, H. S. P.; BOZZA, M. T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PLoS One**, Rio de Janeiro, v. 6, , nº 9, p. 1-8, Sep., 2011.

CHALLIS, J. R.; LOCKWOOD, C. J.; MYATT, L.; NORMAN, J. E.; STRAUSS III, J. F.; PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. **Reprod Sci.**, New Jersey, v. 16, nº 2, p. 206-215, Feb., 2009.

CHANNON, J. Y.; KASPER, L. H. *Toxoplasma gondii*- induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. **Infect. Immun.**, Hanover, v. 64, nº 4, p.1181-1189, Apr., 1996.

CHEN, L. M.; LIU, B.; ZHAO, H. B.; STONE, P.; CHEN, Q.; CHAMLEY, L. IL-6, TNF- α and TGF- β promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation. **Placenta**, Shanghai, v. 31, nº 1, p. 75-80, Jan., 2010.

CHEON, H.; RHO, Y. H.; CHOI, S. J.; LEE, Y. H.; SONG, G. G.; SOHN, J.; WON, N. H.; JI, J. D. Prostaglandin E₂ augments IL-10 signaling and function. **J. Immunol.**, Korea, v. 177, nº2, p. 1092-1100, Jul., 2006.

CHOI, J. C.; HOLTZ, R.; PETROFF, M. G.; ALFAIDY, N.; MURPHY, S. P. Dampening of IFN- γ -inducible gene expression in human choriocarcinoma cells is due to phosphatase-mediated inhibition of the JAK/STAT-1 pathway. **J. Immunol.**, Nova York, v. 178, nº3, p. 1598-1607, Fev., 2007.

CHOW, J. F.; LEE, K. F.; CHAN, S. T.; YEUNG, W. S. Quantification of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA expression in mouse preimplantation embryos and

determination of TGFbeta receptor (type 1 and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract. **Mol. Hum. Reprod.**, Hong Kong, v. 7, n° 11, p. 1047-1056, Nov., 2001.

COLLAZO, C. M.; YAP, G. S.; SEMPOWSKI, G. D.; LUSBY, K. C.; TESSAROLLO, L.; WOUDE, G. F.; SHER, A. TAYLOR, G. A. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential pathogen-specific roles in resistance to infection. **J. Exp. Med.**, Bethesda, v. 194, n° 2, p.181-188, Jul., 2001.

COPPENS, L.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J. C.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**, Baltimore, v. 125, n ° 2, p. 261-274, Apr., 2006.

CROKER, B. A.; KIU, H.; NICHOLSON, S. E. SOCS regulation of the JAK-STAT signaling pathway. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, Australia, v. 19, n °4, p. 414-422, Aug., 2008.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M. A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDIT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M. G.; MANSUR, D. S.; WEINGART, R.; SCHMIDIT, R. R.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Marburg, V. 179, n ° 2, p. 1129-1137, Jul., 2007.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; MOLITOR, N.; SCHWARZ, R. T.; LUER, C. G. K. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols upregulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine macrophages. **Innate Immun.**, Marburg, v. 15, n ° 1, p. 25-32, Fec., 2009.

DECKER, T.; KOVARICK, P. Serine phosphorylation of STATs. **Oncogene**, Vienna, v. 19, n°21, p. 2628-2637, May., 2000.

DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Ithaca, v. 39, n ° 3, p. 193-203, Dec., 2003.

DENKERS, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **J. Biomed. Biotechnol.**, Ithaca, v. 2010, n° 737125, p. 1-7, Nov., 2010.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Microbial. Rev.**, New York, v. 11, n° 4, p. 569-588, Oct., 1998.

DENKERS, E. Y.; YAP, G.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; BUTCHER, B. A.; CASPAR, P.; HEINY S, SHER A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, United States, v.159, n° 4, p. 1903-1908, Aug., 1997.

DIETRICH, J. B. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. **J. Neuroimmunol.**, Strasbourg, v. 128, n° 1-2, p. 58-68, Jul., 2002.

DIMITRIADIS, E.; ROBB, L.; LIU, Y. X.; ENDERS, A. C.; MARTIN, H.; STOIKOS, C.; WALLACE, E.; SALAMONSEN, L. A. IL-11 and IL-11R alpha immunolocalization at primate implantation sites supports a role for IL-11 in placentation and fetal development. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, Clayton, v. 147, n° 1, p. 3809-3817, Apr., 2006.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, Nova York, v. 141, n° 7, p. 2407-2412, Oct., 1988.

DONNELLY, R. P.; DICKENSHEETS, H.; FINBLOOM, D. S. The Interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. **J. Interferon. Cytokine. Res.**, Bethesda, v. 19, n °6, p. 563-573, Jun., 1999.

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

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr. Opin. Immunol.**, Freiburg, v. 22, n° 4, p.461-466, Aug., 2010.

DZIADEK, B.; DZIADEK, J.; DLUGONSKA, H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. **Exp. Parasitol.**, Polônia, v. 115, nº 3, p. 277-282, Mar., 2007.

ENTRICAN, G.; WATTEGEDERA, S.; CHUI, M.; OEMAR, L.; ROCCHI, M.; McINNES, C. Gamma interferon fails to induce expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and does not control the growth of *Chlamydophila abortus* in BeWo trophoblast cells. **Infect. Immun.**, Edinburgh, v. 70, nº 5, p. 2690-2693, May., 2002.

FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D. A. O.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L. R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **Am. J. Pathol.**, Uberlândia, v. 172, nº 1, p. 50-58, Jan., 2008.

FEST, S.; ALDO, P. B.; ABRAHAMS, V. M.; VISINTIN, I.; ALVERO, A.; CHEN, R.; CHAVEZ, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am. J. Reproduct. Immunol.**, New Haven, v. 57, nº 1, p. 55-66, Jan., 2007.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann. Ist. Super Sanità**, Strasbourg, v. 40, nº 1, p. 71-80, 2004.

FINSTERBUSCH, M.; KHARE, V.; CAMPREGHER, C.; EVSTATIEV, R.; GASCHE, C. An intracytoplasmic IL-10 receptor variant permits rapid reduction in STAT3 activation. **Genes Immun.**, Vienna, v. 12, nº 7, p. 575-581, Oct., 2011.

FITZGERALD, J. S.; POEHLMANN, T. G.; SCHLEUSSNER, E.; MARKERT, U. R. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3). **Hum. Reprod. Update.**, Jena, v. 14, nº 4, p. 335-344, Apr., 2008.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENÓRIO, E. P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUAREZ, I.; SATOSKAR, A. A.; SHENOY, A. S.; TERRAZAS, L. I.;

BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. R. RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.**, United States, v. 22, nº 10, p. 1-11, Oct, 2008.

FRANCO, P. S.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, Uberlândia, v. 32, nº 11, p. 838-844, Nov., 2011.

FROLIK, C. A.; DART, L. L.; MEYRES, C. A.; SMITH, D. M.; SPORN, M. B. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Bethesda, v. 80, nº 12, p. 3676-3680, Jun., 1983.

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukin (IL)-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, Hasama-machi, v. 21., nº 4, p. 354-360, May., 2000.

GABR, M. A.; JING, L.; HELBLING, A. R.; SINCLAIR, S. M.; ALLEN, K. D.; SHAMJI, M. F.; RICHARDSON, W. J.; FITCH, R. D.; SETTON, L. A.; CHEN, J. Interleukin-17 synergizes with IFN γ or TNF α to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells. **J. Orthop. Res.**, United States, v. 29, nº 1, p. 1-7, Jan., 2011.

GAFFURI, B.; VIGANO, P.; NOZZA, A.; GORNATI, G.; DI BLASIO, A. M.; VIGNALI, M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 messenger ribonucleic acid and protein in human term placental cells and its modulation by pro- inflammatory cytokines (interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha). **Biol Reprod.**, United States, v. 58, nº 4, p. 1003-1008, Apr., 1998.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 153, nº 6, p. 2533-2543. Sep., 1994.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 157, n° 2, p. 798-805, Jul., 1996.

GEARING, A. J.; NEWMAN, W. Circulating adhesion molecules in disease. **Immunol. Today**, England, v. 14, n° 10, p. 506-512, Oct., 1993.

GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU, L. R.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. **Am. J. Pathol.**, Überlândia, v. 178, n° 6, p. 2792-2801, Jun., 2011.

HALONEN, S. K.; CHIU, F. C.; WEISS, L. M. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infect. Immun.**, New York, v. 66, n° 10, p. 4989-4993, Oct., 1998.

HAMILTON, T. A.; OHMORI, Y.; TEBO, J. Regulation of chemokine expression by anti-inflammatory cytokines. **Immunol. Res.**, Cleveland, v. 25, n°3, p. 229-245, 2002.

HAN, C.; FU, J.; LIU, Z.; HUANG, H.; LUO, L.; YIN, Z. Dipyrithione inhibits IFN- γ -induced JAK-STAT1 signaling pathway activation and IP-10/CXCL10 expression in RAW264.7 cells. **Inflamm. Res.**, v. 59, n°10, p. 809-816, Oct., 2010.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Rev.**, Fukuoka, v. 13, n°4-5, p. 413-421, Aug-Oct., 2002.

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T. I.; MANASTER, I.; GAZIT, R.; YUTKIN, V.; BENHARROCK, D.; PORGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL,

S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nat. Med.**, Jerusalém, v. 12, n° 9, p. 149-163, Sep., 2006.

HANNA, N.; HANNA, I.; HLEB, M.; WAGNER, E.; DOUGHERTY, J.; BALKUNDI, D.; PADBURY, J.; SHARMA, S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **J. Immunol.**, Providence, v. 164, n° 11, p. 5721-5728, Jun., 2000.

HARADA, H.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, N. The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. **Biochimie**, St. Louis, v. 80, n° 8-9, Aug-Sep., 1998.

HAUSER, W. E.; SHARMA, S. D.; REMINGTON, J. S. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Stanford, v. 131, n° 1, p. 458-463, Jul., 1983.

HERRERO, C.; HU, X.; LI, W. P.; SAMUELS, S.; SHARIF, M. N.; KOTENKO, S.; IVASHKIV, L. B. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. **J. Immunol.**, New York, v. 171, n° 10, p. 5034-5041, Nov., 2003.

HESELER, K.; SPEKKER, K.; SCHMIDT, S. K.; MacKENZIE, C. R.; DAUBENER, W. Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN- γ -induced tryptophan degradation. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Dusseldorf, v. 52, n° 2, p. 273-281, Jan., 2008.

HOLMLUND, U.; CEBERS, G.; DAHLFORS, A. R.; SANDSTEDT, B.; BREMME, K.; EKSTROM, E. S.; SCHEYNIUS, A. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. **Immunology**, Stockholm, v. 107, n° 1, p. 145-151, Sep., 2002.

HU, Y.; EASTABROOK, G.; TAN, R.; MACCALMAN, C. D.; DUTZ, J. P.; von DADELSZEN, P. Decidual NK cell-derived conditioned medium enhances capillary tube and network organization in an extravillous cytotrophoblast cell line. **Placenta**, England, v. 31, n° 3, p. 213-221, Mar., 2010.

HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitol. Today.**, Montana, v. 4, nº 12, p. 340-347, Dec., 1988.

HUGHES, K. R.; BIAGINI, G. A.; CRAIG, A. G. Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Netherlands, v. 169, nº 2, p. 71-78, Feb., 2010.

HUNTER, C. A.; CANDOLFI, E.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunol.**, Palo Alto, v. 84, nº 1, p. 16-20, Jan., 1995.

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.**, Palo Alto, v. 62, nº 7, p. 2818-2824, Jul., 1994.

ISMAIL, M. R.; ORDI, J.; MENENDEZ, C.; VENTURA, P. J.; APONTE, J. J.; KAHIGWA, E.; HIRT, R.; CARDESA, A.; ALONSO, P. L. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. **Hum. Pathol.**, Moçambique, v. 31, nº 1, p. 85-93, Jan., 2000.

JAUNIAUX, E.; GULBIS, B.; SCHANDENE, L.; COLLTTE, J.; HUSTIN, J. Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. **Mol. Human. Reprod.**, Londres, v. 2, nº 4, p. 239-243, Apr., 1996.

JEBBARI, H.; ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J. P.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.**, Glasgow, v. 20, nº 5, p. 231-239, May., 1998.

JOHH, B.; WENINGER, W.; HUNTER, C. A. Advances in imaging the innate and adaptive immune response to *Toxoplasma gondii*. **Future Microbiol.**, Philadelphia, v. 5, nº 9, p. 1321-1328, Sep., 2010.

JONES, H. N.; JANSSON, T.; POWELL, T. L. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, Ohio, v. 297, nº 5, p. 1228-1235, Nov., 2009.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, Colorado, v. 56, nº 5, p. 296-305, May, 2001.

JONES, R. L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J.; SALAMONSEN, L. A. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, Clayton, v. 132, nº 2, p. 217-232, Aug., 2006.

JOVANOVÍC, M.; VÍCOVAC, L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. **Placenta**, Belgrade, v. 30, nº 4, p. 320-328, Apr., 2009.

JULIANO, P. B.; BLOTTA, M. H. S.; ALTERMANI, A. M. A. ICAM-1 is Overexpressed by Villous Trophoblasts in Placentitis. **Placenta**, Campinas, v. 27, nº 6-7, p. 750-757, Jun-Jul., 2006.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.**, New Orleans, v. 73, nº 1, p. 617-621, Jan., 2005.

KITISIN, K.; SAHA, T.; BLAKE, T.; GOLESTANEH, N.; DENG, M.; KIM, C.; TANG, Y.; SHETTY, K.; MISHRA, B.; MISHRA, L. TGF- β signaling in development. **Sci. STKE.**, Washington, v. 14, p. 1-6, Aug., 2007.

KOGA, K.; ALDO, P. B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, New Haven, v. 35, nº 2, p. 191-202, Apr., 2009.

LABARRERE, C. A.; FAULK, W. P. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and HLA-DR antigens are expressed on endovascular cytotrophoblasts in abnormal pregnancies. **Am. J. Reprod. Immunol.**, United States, v. 33, n° 1, p. 47-53, Jan., 1995.

LACHENMAIER, S. M.; DELI, M. A.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **J. Neuroimmunol.**, Berlim, v. 232, n° 1-2, p. 119-130, Mar., 2011.

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

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacol. Rep.**, Poland, v. 61, n° 1, p. 22-32, Jan.-Feb., 2009.

LI, Y.; MATSUZAKI, N.; MASUHIRO, K.; KAMEDA, T.; TANIGUCHI, T.; SAJI, F.; TANIZAWA, O. Trophoblast-derived tumor necrosis factor-alpha induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Yonago, v. 74, n° 1, p. 184-191, Jan., 1992.

LINDBERG, R. E.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in nude mice. **J. Parasitol.**, Kansas, v. 63, n° 2, p. 219-221, Apr., 1977.

LOCKWOOD, C. J.; MURK, W. K.; KAYISLI, U. A.; BUCHWALDER, L. F.; HUANG, S. J.; ARCURI, F.; LI, M.; GOPINATH, A.; SCHATZ, F. Regulation of interleukin-6 expression in human decidual cells and its potential role in chorioamnionitis. **Am. J. Pathol.**, New Haven, v. 177, n° 4, p. 1755-1764, Oct., 2010.

LUCCHI, N. W.; SARR, D.; OWINO, S. O.; MWALIMU, S. M.; PETERSON, D. S.; MOORE, J. M. Natural hemozoin stimulates syncytiotrophoblast to secrete chemokines and recruit peripheral blood mononuclear cells. **Placenta**, Athens, v. 32, n° 8, p. 579-585, Aug., 2011.

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, Pittsburgh, v. 21, nº 24, p. 3352-3357, Jul., 2003.

LYONS, R. E.; ANTHONY, J. P.; FERGUSON, D. J. P.; BYRNE, N.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, F.; ROBERTS, C. W. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor β and a protective role for interleukin-6. **Infect. Immun.**, Glasgow, v. 69, nº 4, p. 2589-2595, Apr., 2001.

MAKRIGIANNAKIS, A.; MINAS, V.; KALANTARIDOU, S. N.; NIKAS, G.; CHROUSOS, G. P. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. **Trends Endocrinol. Metab.**, Crete, v. 17, nº 5, p. 178-185, Jul., 2006.

MAUBERT, B.; GUILBERT, L. J.; DELORON, P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta. **Infect Immun.**, United States, v. 65, nº 4, p. 1251-1257. Apr., 1997.

McCABE, R. E.; LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, Stanford, v. 150, nº 6, p. 961-962, Dec., 1984.

MEISSER, A.; CAMEO, P.; ISLAMI, D.; CAMPANA, A.; BISCHOF, P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytrophoblastic cells. **Mol. Hum. Reprod.**, Geneva, v. 5, nº 11, p. 1055-1058, Nov., 1999.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, England, v. 39, nº 1, p. 23-39, Jan, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect. Immun.**, Uberlândia, v. 27, nº 2, p. 283-287, Feb., 1980.

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

MOR, G.; ROMERO, R.; ALDO, P. B.; ABRAHAMS, V. M. Is the trophoblast an immune regulator? The role of toll-like receptors during pregnancy. **Crit. Rev. Immunol.**, New Haven, v. 25, n° 5, p. 375-388, 2005.

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

MULLA, M. J.; MYRTOLLI, K.; BROSENS, J. J.; CHAMLEY, L. W.; KWAK-KIM, J. Y.; PAIDAS, M. J.; ABRAHAMS, V. M. Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New Haven, v. 63, n° 5, p. 339-348, May., 2010.

MURRAY, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J. Immunol.**, Memphis, v. 178, n° 5, p. 2623-2629, Mar., 2007.

NAGAMUNE, K.; SIBLEY, L. D. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. **Mol. Biol. Evol.**, Washington, v. 23, n° 8, p. 1613-1627, Jun., 2006.

NAGINENI, C. N.; DETRICK, B.; HOOKS, J. J. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. **Infect Immun.**, United States, v. 68, n° 1, p. 407-410, Jan., 2000.

NAGINENI, C. N.; DETRICK, B.; HOOKS, J. J. Transforming growth factor- β expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis. **Clin. Exp. Immunol.**, Bethesda, v. 128, n° 2, p. 372-378, May., 2002.

NARUSE, K.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; ROBSON, S. C.; SEARLE, R. F.; LASH, G. E. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first

trimester of human pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, Newcastle, v. 86, n°2, p. 148-150, Nov., 2010.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A. D.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta**, England, v. 27, n° 6-7, p. 691-698, Jun.-Jul., 2006.

ORDI, J.; ISMAIL, M. R.; VENTURA, P. J.; KAHIGWA, E.; HIRT, R.; CARDESA, A.; ALONSO, P. L.; MENENDEZ, C. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. **Am. J. Surg. Pathol.**, Barcelona, v. 22, n° 8, p. 1006-1011, Aug., 1998.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, Memphis, v. 28, n°4, p. 477-487, Apr., 2008.

OUFKIR, T.; VAILLANCOURT, C. Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT2A receptor activates both STAT-3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell. **Placenta**, Laval, artigo “in press”, <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.005>, 2011.

PAIVA, P.; SALAMONSEN, L. A.; MANUELPILLAI, U.; WALKER, C.; TAPIA, A.; WALLACE, E. M.; DIMITRIADIS, E. Interleukin-11 promotes migration, but not proliferation, of human trophoblast cells, implying a role in placentation. **Endocrinology**, Clayton, v. 148, n° 11, p. 5566-5572, Nov., 2007.

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

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

PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; KLEIN, J.P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. **Immunol. Cell. Biol.**, Strasbourg, v. 83, n° 5, p. 483-489, Oct., 2005.

PFEFFERKON, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **J. Interferon. Res.**, Hanover, v. 6, n° 3, p. 267-279, Jun., 1986.

PINARD, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. **J. Midwifery. Women. Health.**, Morgantown, v. 48, n° 5, p. 308-316, Sep-Oct., 2003.

PIPER, J.; WEN, T. Perinatal cytomegalovirus and toxoplasmosis: challenges of antepartum therapy. **Clin. Obstet. Gynecol.**, San Antonio, v. 42, n° 1, p. 81-96, Mar., 1999.

PLATANIAS, L. C.; FISH, E. N. Signaling pathways activated by interferons. **Exp. Hematol.**, Chicago, v. 27, n° 11, p. 1583-1592, Nov., 1999.

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*. **Infect Immun.**, Madison, v. 76, n° 1, p. 103-110. Jan., 2008.

PORTER, S. B.; SANDE, M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **N. Engl. J. Med.**, San Francisco, v. 327, n° 23, p. 1643-1648, Dec., 1992.

QING, Y.; STARK, G. R. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. **J. Biol. Chem.**, Cleveland, v. 279, n° 40, p. 41679-41685, Oct., 2004.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1 / Th2 / Th3 paradigm. **Semin. Immunol.**, Kuwait, v. 13, n° 4, p. 219-227, Aug., 2001.

RAKESH, K.; AGRAWAL, D. K. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, Omaha, v. 70, n°5, p. 649-657, Sep., 2005.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, O. J. editores. **Infection diseases of the fetus and newborn infant**. 5º ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 205-356.

RINDSJO, E.; HOLMLUND, U.; SVERREMARK-EKSTROM, E.; PAPADOGIANNAKIS, N.; SCHEYNIUS, A. Toll-like receptor 2 expression in normal and pathologic human placenta. **Hum. Pathol.**, Sweden, v. 38, n °3, p. 468-473, Mar., 2007.

ROBERTS, D. D.; SHERWOOD, J. A.; SPITALNIK, L.; PANTON, S. L.; HOWARD, L. J.; DIXIT, R. J.; FRAZIER, V. M.; MILLER, W. A.; GINSBURG, L. H. Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. **Nature**, v. 318, n ° 6041, p. 64-66, Nov., 1985.

ROGERSON, S. J.; CHAIYAROJ, S. C.; NG, K.; REEDER, J. C.; BROWN, G. V. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Exp. Med.**, Victoria, v. 182, n ° 1, p. 15-20, Jul., 1995.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; SEABRA, S.; SANT'ANNA, C.; GONÇALVES, J. G.; BOZZA, M.; MOURA-NETO, V.; DE SOUZA, W. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon- γ -activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor- β 1 production by infected microglia. **Am. J. Pathol.**, Rio de Janeiro, v. 167, n° 4, p. 1021-1031, Oct., 2005.

SAHA, B.; PRASANNA, S. J.; CHANDRASEKAR, B.; NANDI, D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon- γ . **Cytokine**, Bangalore, v. 50, n° 1, p. 1-14, Apr., 2010.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **J. Reprod. Immunol.**, Sugitani Toyama-shi, v. 47, n° 2, p. 87-103, Jul., 2000.

SANTIBAÑEZ, J. F.; QUINTANILLA, M.; BERNABEU, C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin. Sci.**, Belgrade, v. 121, nº 6, p. 233-251, Sep., 2011.

SCHLÜTER, D.; LOHLER, J.; DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. **J Neuroimmunol.**, Netherlands, v. 31, nº 3, p. 185-198. Mar., 1991.

SHAPIRA, S.; HARB, O. S.; MARGARIT, J.; MATRAJT, M.; HAN, J.; HOFFMANN, A.; FREEDMAN, B.; MAY, M. J.; ROOS, D. S.; HUNTER, C. A. Initiation and termination of NF- κ B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Cell. Sci.**, Philadelphia, v. 118, nº 15, p. 3501-3508, Aug., 2005.

SHARMA, S.; YANG, B.; XI, X.; GROTTA, J. C.; ARONOWSKI, J.; SAVITZ, S. I. IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathway. **Brain Res.**, Houston, v. 1373, p. 189-194, Feb., 2011.

SHAW, M. H.; REIMER, T.; SÁNCHEZ-VALDEPEÑAS, C.; WARNER, N.; KIM, Y. G.; FRESNO, M.; NUÑEZ, G. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. **Nat. Immunol.**, Michigan, v. 10, nº 12, p. 1-9, Dec., 2009.

SHEN, Y.; SCHLESSINGER, K.; ZU, X.; MEFFRE, E.; QUIMBY, F.; LEVY, D. E.; DARNELL, J. E. Jr. Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. **Mol. Cell Biol.**, New York, v. 24, nº 1, p. 407-419, Jan., 2004.

SHUAI, K., LIU, B. Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, Los Angeles, v. 3, nº 11, p. 900-911, Nov., 2003.

SIANO, J. P.; GRADY, K. K.; MILLET, P.; WICK, T. M. *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, Atlanta, v. 59, nº 1, p. 77-79, Jul., 1998.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, St. Louis, v. 304, nº 5668, p. 248-253, Apr., 2004.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor (TGF- β). **J. Exp. Med.**, Washington, v. 174, nº 3, p. 539-545, Sep., 1991.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Exp. Parasitol.**, Uberlândia, v. 126, nº 2, p. 167-77, Oct., 2010.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenone formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect. Immun.**, Belo Horizonte, v. 70, nº 2, p. 859-868, Feb., 2002.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res.**, São Paulo, v. 105, nº 4, p. 893-898. Oct., 2009.

SIMPSON, H.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N.; BARBER, A.; LYALL, F. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. **Placenta**, Newcastle-upon-Tyne, v. 23, nº 1, p. 44-58, Jan., 2002.

SKARIAH, S.; McINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol. Res.**, New York, v. 107, nº 2, p. 253-260, Jun., 2010.

SPOELSTRA, F. M.; POSTMA, D. S.; HOVENGA, H.; NOORDHOEK, J. A.; KAUFFMAN, H. F. Interferon- γ and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. **Eur. Respir. J.**, Switzerland, v. 14, nº 4, p. 759-766, Oct., 1999.

STEPHANOU, A.; MYATT, L.; EIS, A. L.; SARLIS, N.; JIKIHARA, H.; HANDWERGER, S. Ontogeny of the expression and regulation of interleukin-6 (IL-6) and IL-1 mRNAs by human trophoblast cells during differentiation *in vitro*. **J. Endocrinol.**, Ohio, v. 147, n° 3, p. 487-496, Dec., 1995.

STRAUB, K.; CHENG, S.; SOHN, C.; BRADLEY, P. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. **Cell Microbiol.**, Los Angeles, v. 11, n° 4, p. 590-603. Apr., 2009.

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. **J. Immunol.**, Palo Alto, v. 147, n° 11, p. 3955-3959, Dec., 1991.

SUGIYAMA, T.; CUEVAS, L. E.; BAILEY, W.; MAKUNDE, R.; KAWAMURA, K.; KOBAYASHI, M.; MASUDA, H.; HOMMEL, M. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in Plasmodium falciparum-infected placenta. **Placenta**, England, v. 22, n° 6, p. 573-579. Jul., 2001.

SUKHUMAVASI, W.; EGAN, C. E.; WARREN, A. L.; TAYLOR, G. A.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; DENKERS, E. Y. TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. **J. Immunol.**, Ithaca, v. 181, n° 5, p. 3464-3473, Sep., 2008.

SUMAN, P.; POEHLMANN, T. G.; PRAKASH, G. J.; MARKERT, U. R.; GUPTA, S. K. Interleukin-11 increases invasiveness of JEG-3 choriocarcinoma cells by modulating STAT3 expression. **J. Reprod. Immunol.**, Jena, v. 82, n° 1, p. 1-11, Oct., 2009.

TABIBZADEH, S.; KONG, Q. F.; BABAKNIA, A.; MAY, L. T. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. **Hum. Reprod.**, Tampa, v. 10, n° 10, p. 2793-2799, Oct., 1995.

TAMURA, T.; YANAI, H.; SAVITSKY, D.; TANIGUCHI, T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. **Annu. Rev. Immunol.**, Tokyo, v. 26, p. 535-584, 2008.

TANGRI, S.; RAGHUPATHY, R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. **Biol. Reprod.**, New Delhi, v. 49, nº 4, p. 850-856, Oct., 1993.

TAUBERT, A.; KRÜLL, M.; ZAHNER, H.; HERMOSILLA, C. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Netherlands, v. 112, nº 3-4, p. 272-283, Aug., 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, Bünteweg, v. 30, nº 12-13, p. 1217-1258, Nov., 2000.

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Baltimore, v. 51, nº 2, p. 679-688, Feb., 2007.

TERRAZAS, C. A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L. I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E. A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Exp. Parasitol.**, Mexico, v. 126, nº 3, p. 348-358, Nov., 2010.

TSUKIHARA, S.; HARADA, T.; DEURA, I.; MITSUNARI, M.; YOSHIDA, S.; IWABE, T.; TERAKAWA, N. Interleukin-1 β -induced expression of IL-6 and production of human chorionic gonadotropin in human trophoblast cells via nuclear factor- κ B activation. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Yonago, v. 52, nº 3, p. 218-223, Sep., 2004.

TURNER, G.; MORRISON, H.; JONES, M.; DAVIS, T. M.; LOOAREESUWAN, S.; BULEY, I. D.; GATTER, K. C.; NEWBOLD, C. I.; PUKRITAYKAMEE, S.; NAGACHINTA, B.; BUSSARIN, N.; WHITE, N. J.; BERENDT, A. R. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **Am. J. Pathol.**, Oxford, v. 145, nº 5, p. 1057-1069, Nov., 1994.

UNNO, A.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Up-regulation of hyaluronan receptors in *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 391, n° 1, p. 477-480, Jan., 2010.

VAN DE STOLPE, A.; VAN DER SAAG, P. T. Intercellular adhesion molecule-1. **J Mol Med.** Netherlands, v. 74, n° 1, p. 13-33. Jan., 1996.

VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A.; FARGE, D. Transforming growth factor- β signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. **Autoimmun. Rev.**, Paris, v. 5, n°8, p. 563-569, Oct., 2006.

ZHAO, Y.; FERGUSON, D. J.; WILSON, D. C.; HOWARD, J. C.; SIBLEY, L. D.; YAP, G. S. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. **J. Immunol.**, New Jersey, v.182, n° 6, p.3775-81, Mar., 2009.

ZIMMERMANN, S.; MURRAY, P. J.; HEEG, K.; DALPKE, A. H. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN- γ signaling. **J. Immunol.**, Heidelberg, v. 176, n° 3, p. 1840-1847, Feb., 2006.

ZHOU, H.; FU, G.; YU, H.; PENG, C. Transforming growth factor-beta inhibits aromatase gene transcription in human trophoblast cells via Smad2 signaling pathway. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, Ontario, v. 7, n° 146, p. 1-10, Dec., 2009.

ZHOU, X. W.; KAFSACK, B. F. C.; COLE, R. N.; BECKETT, P.; SHEN, R. F.; CARRUTHERS, V. B. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, n° 40, p. 34233-34244, Oct., 2005.

ZHU, X.; WEN, Z.; XU, L. Z.; DARNEll, Jr, J. E. STAT1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated JAK2 kinase. **Mol. Cell. Biol.**, New York, v. 17, n°11, p. 6618-6623, Nov., 1997.

WAN, K. L.; CARRUTHERS, V. B.; SIBELY, L. D.; AJIOKA, J. W. Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, St. Louis, v. 84, nº 2, p. 203-214, Feb., 1997.

WANG, X.; KANG, H.; KIKUCHI, T.; SUZUKI, Y. Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. **Infect. Immun.**, United States, v. 72, nº 8, p. 4432–4438, Aug., 2004.

WEN, Z.; ZHONG, Z.; DARNELL, Jr, J. E. Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. **Cell**, New York, v. 82, nº2, p. 241-250, Jul., 1995.

WINDISH, H. P.; LIN, P. L.; MATTILA, J. T.; GREEN, A. M.; ONUOHA, E. O.; KANE, L. P.; FLYNN, J. L. Aberrant TGF-beta signaling reduces T regulatory cells in ICAM-1-deficient mice, increasing the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Leukoc Biol.**, United States, v. 86, nº 3, p. 713-725. Sep., 2009.

ANEXO



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

Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 197/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 088/08

Projeto Pesquisa: “Análise das proteínas que medeiam a sinalização intracelular em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) submetidas à infecção por *Toxoplasma gondii* e tratadas com IL-10, TGF-β1 e IFN-γ”.

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

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

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

O CEP/UFU lembra que:

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

Data para entrega 1ºRelatório Parcial: dezembro/2008

Data para entrega 1ºRelatório Parcial: dezembro/2009

Data para entrega 1ºRelatório Parcial: dezembro/2010

Data para entrega Relatório Final: dezembro/2011

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBSERVAÇÃO: nos próximos protocolos, enviar o cronograma mês a mês

Uberlândia, 30 de maio de 2008.

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

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, juntamente com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.