



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**O efeito da infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos gestantes CB10-H2
(H-2^b) e C57BL/KsJ (H-2^d)**

LOYANE BERTAGNOLLI COUTINHO

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunopatologia (IMPAT)

**O efeito da infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos gestantes CB10-H2
(H-2^b) e C57BL/KsJ (H-2^d)**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Neide Maria da Silva

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2016

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

-
- C871e
2016 Coutinho, Loyane Bertagnolli, 1984
 O efeito da infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos gestantes CB10-H2 (H-2b) e C57BL/KsJ (H-2d) / Loyane Bertagnolli Coutinho. - 2016.
 109 f. : il.
- Orientadora: Neide Maria de Silva.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose congênita - Teses. 3. Aborto - Teses. 4. Mastócitos - Teses. I. Silva, Neide Maria de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Loyane Bertagnolli Coutinho

“O efeito da infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos gestantes CB10-H2 (H2b) e C57BL/KsJ (H2d)”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de fevereiro de 2016.


Profa. Dra. Idessania Nazareth da Costa
UEL


Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM


Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
ICBIM/UFU


Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo
ICBIM/UFU


Profa. Dra. Neide Maria da Silva – orientadora
ICBIM/UFU

Dedicatória

Aos meus pais que estão sempre ao meu lado, que me escutam, me aconselham e me amparam. Se existem pessoas que verdadeiramente torcem por mim na vida, essas pessoas são vocês. Sou eternamente grata por todas as oportunidades que me proporcionaram inclusive a de me tornar Doutora! Não existe amor maior do que o que eu sinto por vocês! Obrigada por tudo!

Ao meu irmão, Lucas, obrigada por ser meu fã incondicional! Também sou sua fã e eterna admiradora. Saber que existem pessoas que acreditam cegamente em nós nos dão forças para seguirmos em frente, sempre. Aos meus irmãos André e Dafne que apesar da distância, confiam e acreditam em mim!

Mário, meu colega de trabalho, meu amigo, meu namorado, meu noivo, meu amor! Obrigada por tamanha dedicação. Ter você ao meu lado desde o dia em que te conheci mudou a minha vida! Que bom que você veio para ficar! Amo você!

“Se você não recebe nenhuma crítica, provavelmente você não tem nenhum sucesso.”

(Malcolm X)

Agradecimentos especiais

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Neide Maria da Silva, por ter me acolhido de volta ao IMPAT após quase um ano em que fiquei afastada do laboratório. Obrigada pela confiança, isso reforça em mim o fato de que eu não poderia ter feito escolha melhor. Obrigada por todos os ensinamentos, ideias, puxões de orelha, convívio e por compartilhar, não só conhecimento, mas os problemas, as conquistas, as tristezas e as alegrias da vida. Obrigada por ser, também, responsável pelo meu crescimento profissional, hoje eu vejo como tudo foi tão importante. Obrigada por estar presente sempre que necessário, por me orientar, por criticar, por sugerir e por elogiar, cada qual ao seu tempo. E lá se foram mais quatro anos de convivência e aprendizagem, quatro anos dos quais eu só tenho que agradecer!

Ester (Xuxu), obrigada pela paciência em revisar todas as análises estatísticas deste trabalho, juntamente com o Paulo Victor, que mesmo distante não se fez ausente e nem nos negou ajuda por videoconferência, rs!!! Obrigada Xuxu por, gentilmente, ter lido os meus resultados e todas as infinitas condições experimentais, sei que você teve que ler mais de uma vez e agradeço pelas leituras atentas e por todas as contribuições.

Tudo foi de grande valia!

Obrigada Mário, por ter ido para a bancada comigo sempre que precisei e por todos os finais de semana e feriados que você me ajudou no laboratório, além de tudo o que fez por mim enquanto estive em Monte Carmelo. Sua ajuda fez toda a diferença!

Agradecimentos

Ao final de cada obstáculo vencido eu compreendo todos os motivos e agradeço a Deus por ter sido tão perfeito em guiar todos os meus passos.

Obrigada pessoal do Laboratório de Imunopatologia (IMPAT) pelos momentos de descontração, pelo convívio e por tornarem os dias no laboratório sempre muito agradáveis! Tenho colegas de laboratórios, mas também amigos mais que especiais!

Minhas amigas de jornada e de vida, Rosiane, Xuxu, Nágilla, Bellisa e Nayhanne! Quantas memórias, muitas histórias... Eu agradeço por poder dividir com vocês todas as coisas. Obrigada pela convivência, pelas conversas, pelas baladas, pelos conselhos, pelas lágrimas e pelos sorrisos. Obrigada por serem amigas que fazem toda a diferença na minha vida!

A secretária Juscélia e aos técnicos: Fabrício, Ester, Mariani e Rosiane. Obrigada pelo carinho, apoio e ajuda de vocês.

As secretárias da Pós-graduação, Luceleide e Lucélia, obrigada por toda a atenção que sempre tiveram comigo.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG, CNPq e Quali-UFU.

Lista de abreviaturas

ABC – Complexo Avidina-Biotina

ABTS - 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolína- ácido sulfônico

CBEA - Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais

dG- Dias de gestação

dI – Dias de infecção

DAB - Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

DP - Desvio padrão

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia-Granulócito-Macrófago

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HE - Hematoxilina-Eosina

IE - Índice ELISA

IFN- γ - Interferon- γ

IgG - Imunoglobulina

IL – Interleucina

iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível

LIF – Fator de inibição de leucemia

MCP-1 (CCL2) – Proteína quimiotática para monócito 1

MG – Minas Gerais

MIP-1- α (CCL3) – Proteínas inflamatória de macrófago 1 α

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NG – Não gestante

NI – Não infectada

NK – Células Natural Killer

nNOS - Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Enzimas óxido nítrico sintases

OPD - O-fenilenodiamina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T - Solução salina tamponada com fosfato-Tween

PBS-TM - Solução salina tamponada com fosfato-Tween-Molico

PCR – Reação de cadeia da polimerase

SNC - Sistema Nervoso Central

T reg - Células T reguladoras

TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento β

Th – Células T helper

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TNFRp55 – Subunidade 55 do receptor do Fator de Necrose Tumoral

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

VEG-F - fator de crescimento endotelial vascular

VPF – Fator de Permeabilidade Vascular

Lista de figuras

Figura 1. Organização básica de um taquizoíto	15
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Figura 3. Fotomicrografia representativa do útero de uma fêmea CB10-H2 aos 18 dias de gestação e 18 dias de infecção (18dG/18dI)	51
Figura 4. Fotomicrografia representativa das mudanças histológicas no útero e decídua pela coloração por Hematoxilina-Eosina em fêmeas CB10-H2 infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> por via oral	53
Figura 5. Parasitismo tecidual em fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> por via oral	56
Figura 6. Mensuração de citocinas nas amostras de soro de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ	62
Figura 7: Quantificação das mensagens de citocinas no homogenato de útero/embriões ou placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ	68
Figura 8: Contagem de mastócitos no útero/placenta de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ	75
Figura 9: Fotomicrografia representativa da presença de mastócitos no útero de fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ não gestantes, aos 8 e 18 dias de infecção	76
Figura 10: Níveis de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b anti- <i>T. gondii</i> em amostras de soro de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ	79

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista das sequências de primers utilizados para os ensaios de expressão gênica por qPCR	43
Tabela 2. Presença de fetos no útero e índice de reabsorção fetal em fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ	49
Tabela 3. Presença de embriões ou fetos no útero em fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ	50

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.2. Ciclo biológico	17
1.3. Epidemiologia e características clínicas da toxoplasmose	22
1.4. Toxoplasmose congênita e resposta imunológica	24
1.5. Mastócitos na gestação e infecção	27
1.6. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)	30
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. Materiais e Métodos	37
3.1. Animais de experimentação	37
3.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	37
3.3. Organismos infecciosos	37
3.4. Acasalamento e detecção de prenhez	37
3.5. Infecção experimental, coleta e processamento do material	38
3.6. Análises histológicas	39
3.7. Imunohistoquímica para detecção de parasitos	40
3.8. Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para CMA1, MCPT4, FOXP3, Sag-1, IL-13, IL-10, TGF- β , IL-17 IFN- γ e TNF no útero e placenta dos animais experimentais	41
3.8.1. Extração de mRNA e confecção do DNA complementar (cDNA)	41
3.8.2. Quantificação das mensagens por reação de PCR quantitativa (qPCR)	42
3.9. Mensuração de citocinas no soro por “Cytometric Beads Array” (CBA)	44
3.10. Detecção de anticorpos IgG específicos anti- <i>T. gondii</i>	44
3.11. Detecção de isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2a/IgG2b específicos anti- <i>T. gondii</i>	45
3.12. Análise estatística	46
3.13. Normas de Biossegurança	46
4. Resultados	47
5. Discussão	80
6. Conclusões	92
7. Bibliografia	94
ANEXO I	108

Resumo

O sucesso da gestação está relacionado com um perfil de resposta imunológica tipo Th2 e envolvimento de vários mecanismos para manutenção da tolerância materno-fetal, incluindo as moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Entretanto, a infecção por *Toxoplasma gondii* induz um perfil de resposta tipo Th1 que é associada aos resultados prejudiciais da gestação. Para investigar a influência do haplotipo do MHC na toxoplasmose congênita, fêmeas de camundongos congênicos, C57BL/KsJ (H-2^d) e CB10-H2 (H-2^b) foram oralmente infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 e 18 dias após a infecção. As fêmeas C57BL/KsJ apresentaram alto número de parasitos nos pulmões aos 8dI, comparadas às fêmeas CB10-H2 e ambas as linhagens apresentaram alto número de parasitos no cérebro aos 18dI, independentemente da gestação. Não foram encontrados parasitos no útero/placenta em nenhuma das linhagens, independente do tempo de infecção e não houve diferença no índice de aborto dentre as fêmeas infectadas, apesar da linhagem CB10-H2 ter apresentado maiores danos histológicos comparada à C57BL/KsJ aos 8 e 18 dias de gestação e infecção. A infecção nas fêmeas C57BL/KsJ não-gestantes provocou aumento na migração de mastócitos para o útero enquanto que a gestação diminui tal migração. Além disso, camundongos C57BL/KsJ apresentaram altos níveis sistêmicos de IFN- γ aos 8dI e TNF e IL-6 aos 8 e 18dI comparados aos CB10-H2 gestantes e não-gestantes. Ainda, no útero/placenta das fêmeas CB10-H2 a gestação aumentou os níveis de expressão de FOXP3 e, sob a infecção, houve aumento no nível de expressão de IL-10, IL-13 e IL-17. Nossos resultados sugerem que, tanto o background genético como o haplotipo do MHC sejam essenciais na proteção contra os índices de reabsorção fetal e aborto nos casos de toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita, aborto, camundongos congênicos, mastócitos, haplotipo do MHC.

Abstract

Successful pregnancy is related to Th2 immune response profile, including molecules encoded by the major histocompatibility complex (MHC); however, *Toxoplasma gondii* infection induces Th1 immune response that is associated with adverse pregnancy outcome. To investigate the influence of MHC haplotype in pregnancy outcome in *T. gondii*-infected animals, congenic mice, C57BL/KsJ and CB10-H2 females, were orally infected with ME-49 strain on the first day of pregnancy and sacrificed on 8 and 18 days post-infection. C57BL/KsJ showed higher number of parasites in the lungs at 8dI, irrespective of pregnancy, compared with CB10-H2; and both CB10-H2 and C57BL/KsJ showed high number of parasites in the brain at 18dI, irrespective of pregnancy. Parasites were not found in the uterus/placenta in both lineages of mice irrespective of the day of infection and there was no difference in abortion rate of infected mice, although CB10-H2 mice presented higher histological damage compared with C57BL/KsJ at 8 and 18 days of pregnancy and infection. Infection of non-pregnant C57BL/KsJ increased mast cell infiltration in the uterus, and gestation decreased this cell numbers. Furthermore, C57BL/KsJ presented higher IFN- γ levels systemically on 8dI; and TNF and IL-6 on 8 and 18dI compared with CB10-H2, despite gestation or not. Additionally, in the uterus/placenta of CB10-H2, pregnancy increased FOXP3 and under infection IL-10, IL-13 and IL-17 expression levels. Our data suggest that both genetic background and MHC haplotypes are essential to protect against reabsorption rate and abortion in congenital toxoplasmosis.

Key Words: Congenital toxoplasmosis, Abortion, Congenic mice, Mast cells, MHC haplotype.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário do filo Apicomplexa que é capaz de infectar todos os mamíferos e aves normalmente a partir da ingestão de alimentos contaminados (DUBEY, 2004; ELMORE et al., 2010).

As espécies que fazem parte do filo Apicomplexa possuem algumas características em comum, dentre elas a presença de um complexo apical de estruturas de citoesqueleto especializadas; além de organelas de secreção como roptrias e micronemas, as quais, juntamente com os grânulos densos, são responsáveis pelo reconhecimento da célula hospedeira, além de fixação, invasão, estabelecimento e manutenção do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997) (Figura 1).

Figura 1. Organização básica de um taquizóito.

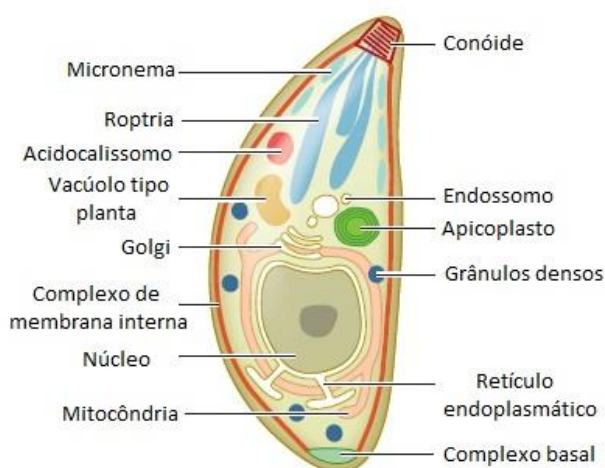


Figura 1. Organização básica do taquizóito. As organelas na via de secreção são mostradas em branco, enquanto que as organelas de secreção propriamente ditas são mostradas em três tonalidades de azul (Figura adaptada de BLADER et al., 2015).

A invasão celular é ativa e dependente de interações de moléculas presentes na superfície do parasito com moléculas presentes na membrana da célula hospedeira e leva cerca de 20 segundos para ocorrer (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007;

SHARMA; CHITNIS, 2013; WALKER et al., 2014) e a disseminação rápida dos parasitos está relacionada com a capacidade dos mesmos em infectar as células migratórias do sistema imune como monócitos, linfócitos e células dendríticas (LAMBERT et al., 2006; SIBLEY, 2011) e, assim, alcançar diversos tecidos e atravessar barreiras biológicas como placenta e as barreiras hematoencefálica e hemoretiniana (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; UNNO et al., 2008).

As cepas de *T. gondii* isoladas em humanos e outros animais na Europa e América do Norte são classificadas em três linhagens genéticas (Tipos I, II e III) consideradas clonais e com baixa diversidade genética, porém, isolados de *T. gondii* do Brasil são geneticamente diferentes daqueles da Europa e América do Norte, com traços biológicos distintos, sendo estas cepas atípicas da América do Sul denominadas cepas “exóticas” pertencentes a diversos haplogrupos que são endêmicos da América do Sul (LEHMANN et al., 2006; KHAN et al., 2007; PENA et al., 2008).

As cepas do tipo I são altamente virulentas para camundongos e possivelmente humanos (GRIGG et al., 2001) enquanto que as cepas do tipo II e III são relativamente menos virulentas (SIBLEY et al., 1992; HOWE et al., 1996, HOWE et al., 1997).

Considerando a infecção por *T. gondii* em humanos, na Europa e América do Norte a maioria dos casos de toxoplasmose e toxoplasmose congênita está associada com a cepa do tipo II, com baixas proporções das cepas tipos I e III (HOWE et al., 1997; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009). Na América do Sul, tanto os casos assintomáticos quanto os clínicos, são associados com alta incidência da cepa do tipo I (FERREIRA et al., 2008). No entanto, devido à alta diversidade genética das cepas recombinantes de *T. gondii* isoladas no Brasil, a toxoplasmose adquirida e congênita podem provavelmente ocorrer com todas estas cepas (FUX et al., 2003; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

Análises dos isolados de animais domésticos no Brasil, feitas pela técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) revelaram mais de 100 genótipos, sendo quatro desses considerados linhagens clonais comuns e designadas tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2012). Além disso, duas cepas de *T. gondii* foram isoladas a partir de galinhas na cidade de Uberlândia/MG e nomeadas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 as quais exibem genótipos tipo BrII e BrI, respectivamente (LOPES et al., 2016).

Nos casos de toxoplasmose congênita, a transmissão para o feto ocorre predominantemente quando a mulher adquire a primeira infecção durante a gestação (REMINGTON et al., 2011; CARLIER et al., 2012). Naquelas imunocompetentes que adquiriram a infecção antes da gestação é preconizado que os mecanismos imunes adquiridos sejam capazes de prevenir a transmissão da infecção para os fetos (BOJAR; SZYMANSKA, 2010). No entanto, alguns casos de toxoplasmose congênita foram descritos em recém-nascidos de mães imunocompetentes que adquiriram a infecção antes da gestação sugerindo a ocorrência de reinfecção materna durante a gestação (SILVEIRA et al., 2003; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009) e levantando a questionamentos sobre a hipótese de que a primeira infecção por *T. gondii* induza imunidade protetora capaz de prevenir a transmissão vertical nos casos de reinfecção pelo parasito (FRANCO et al., 2015).

1.2. Ciclo biológico

Entre as espécies de parasitos de animais, *T. gondii* se encontra como uma das mais comuns e bem conhecidas, sendo capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, inclusive os humanos e, apesar da maioria dos parasitos na natureza terem seus hospedeiros específicos e somente serem transmitidos por meio de ciclo fecal-oral, o *T. gondii* pode, também, ser transmitido via transplacentária e ainda por meio de

canibalismo, o que justifica sua ampla distribuição e elevada soroprevalência (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; JONES; DUBEY, 2010).

Além disso, os hospedeiros intermediários como o homem, por exemplo, podem adquirir a infecção por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos e ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas (BOOTHROYD, 2009), bem como por ingestão de taquizoítos por meio de líquidos biológicos (saliva, esperma, leite), transfusões de sangue, transplantes de órgãos contaminados e acidentes laboratoriais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013).

O parasito apresenta três formas distintas e infectantes: esporozoítos contidos em oocistos, taquizoítos, que representam o estágio de multiplicação rápida do parasito e, sob pressão do sistema imunológico, dão origem aos bradizoítos, de crescimento lento, que ficam contidos no interior de cistos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos como pulmão, fígado e rins, eles são mais prevalentes em tecidos musculares e neurais, inclusive cérebro, olho e músculos esqueléticos e cardíacos (JONES; DUBEY, 2010). Essa estrutura de cisto pode permanecer de forma latente durante toda a vida (MILLER et al., 2009).

O ciclo de vida de *T. gondii* apresenta uma fase sexuada, que ocorre somente no intestino dos hospedeiros definitivos (felídeos) e resulta na excreção de oocistos nas fezes destes animais, e uma assexuada, que ocorre nos hospedeiros intermediários (MILLER et al., 2009) (Figura 2).

A fase sexuada do ciclo, denominada gametogonia, inicia-se com a ingestão de cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítos e acontece nas células epiteliais do intestino delgado dos felídeos (BOOTHROYD, 2009), sendo que o ciclo induzido pela ingestão de cistos teciduais, contendo bradizoítas, é o mais elucidado, no qual a parede

do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago dos animais promovendo a liberação dos bradizoítas que penetram nas células epiteliais do intestino e começam a se multiplicar por um processo denominado endodiogenia (merogonia) com consequente formação de merozoítas no interior de vacúolos parasitóforos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2004).

Quando ocorre rompimento da célula infectada, os merozoítos são liberados e penetram em outras células epiteliais dando origem as formas sexuais (masculina e feminina) que após processo de maturação formam gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas) os quais saem da célula e fecundam os macrogametas. Após a fertilização, há formação de uma parede externa ao redor do zigoto originando o oocisto imaturo que é liberado nas fezes dos hospedeiros definitivos (FERGUSON, 2002; DUBEY, 2004).

A maturação do oocisto no meio externo ocorre por meio de um processo denominado esporogonia, originando esporozoítos no interior do oocisto, tornando-o infectante aos hospedeiros (FERGUSON, 2002). A ocorrência da infecção dos hospedeiros intermediários se dá por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos, ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas (BOOTHROYD, 2009), ingestão de taquizoítas por meio de líquidos biológicos (saliva, esperma, leite), transplantes de órgãos ou infecções transplacentárias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Nestes hospedeiros distinguem-se duas fases de infecção, sendo uma fase aguda na qual o parasito sofre intensa multiplicação por processo de endodiogenia e forma vacúolos parasitóforos os quais rompem as células parasitadas e liberam taquizoítos que por sua vez irão invadir novas células e assim sucessivamente. A fase crônica é determinada quando os mecanismos imunológicos atuam no sentido de diminuir a

proliferação dos parasitos promovendo a evolução das formas taquizoítos para bradizoítos e consequente formação de cistos. (FERGUSON, 2009).

Uma vez que *T. gondii* pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário, do intermediário para o definitivo, bem como entre hospedeiros definitivos e entre hospedeiros intermediários, ainda não se sabe qual das várias vias de transmissão é epidemiologicamente mais importante (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000). É provável que a ampla distribuição e alta prevalência de *T. gondii* se dê por uma interação de todas as vias de transmissão (HIDE et al., 2009).

Sendo assim, a prevalência da infecção por *T. gondii* não é confinada à presença de certas espécies de hospedeiros e o ciclo do parasito pode continuar indefinidamente por transmissão de cistos teciduais entre hospedeiros intermediários, mesmo na ausência de hospedeiros definitivos, e também por transmissão de oocistos entre hospedeiros definitivos, mesmo na ausência de hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000).

Deste modo, a prevalência mundial do parasito é muito alta entre os diversos animais, variando desde pássaros a uma diversidade de mamíferos, mesmo aqueles que vivem exclusivamente no mar, o que torna *T. gondii* único entre os agentes eucariotas infecciosos (BOOTHROYD, 2009).

Figura 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.

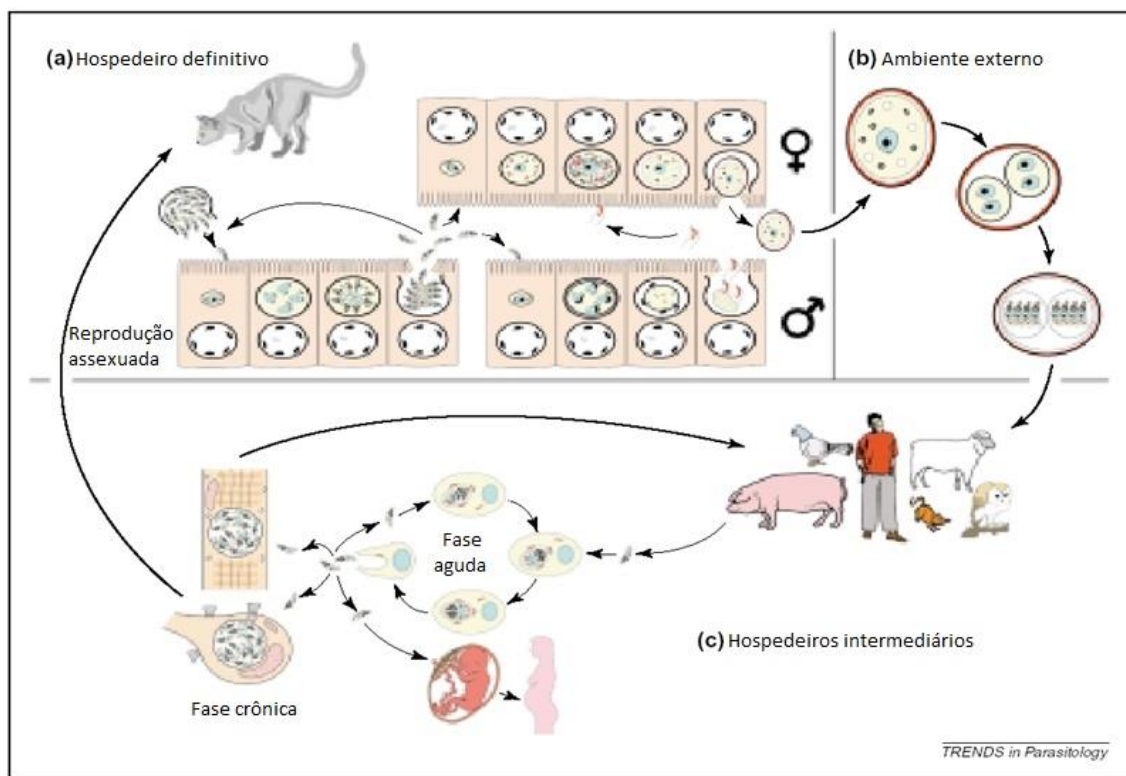


Figura 2. Diagrama representativo do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Os felídeos são os hospedeiros definitivos nos quais ocorre o desenvolvimento da fase sexual no intestino delgado dando origem aos oocistos (A) que, por sua vez, contaminam o ambiente externo (B) e, após a esporulação, podem infectar uma ampla variedade de hospedeiros intermediários a partir da ingestão de alimentos e água contaminada. Nos hospedeiros intermediários ocorre a fase assexuada de reprodução do parasito (C). Após a fase aguda, segue a fase crônica da doença, na qual o parasito está, predominantemente, presente em cistos teciduais localizados na musculatura e cérebro. Os cistos teciduais podem transmitir a infecção para outros hospedeiros intermediários ou para o gato (carnivorismo). Além disso, se a fase aguda ocorre durante a gestação, o parasito pode atravessar a placenta e infectar o feto (transmissão congênita). Movimento do parasito entre os hospedeiros (setas em negrito); Estágios de desenvolvimento do parasito dentro do hospedeiro (setas finas). Adaptado de Ferguson, 2002.

1.3. Epidemiologia e características clínicas da toxoplasmose

T. gondii causa infecções congênicas e abortos, bem como infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos (UNNO; KITO; TAKASHIMA, 2010). É importante ressaltar a relevância da toxoplasmose, uma vez que um terço da população mundial apresenta anticorpos contra o parasito e a soroprevalência aumenta com a idade e varia de acordo com a distribuição geográfica em todo o mundo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; BLADER et al., 2015).

Apesar de ocorrer no mundo todo, a incidência de *T. gondii* é alta em áreas tropicais e decresce com o aumento da latitude (EVENGARD et al., 2001), ou seja, a soroprevalência é baixa em regiões frias e áreas áridas e muito quentes (JONES et al., 2001a). A infecção por este parasito é comum na América do Sul e um estudo feito no Brasil demonstrou que a soroprevalência é alta em pessoas com baixas condições sócioeconômicas, provavelmente devido à transmissão oral (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003), variando entre 50% a 80% (GALISTEU et al., 2007; DUBEY et al., 2012).

Os casos de toxoplasmose congênita nos países desenvolvidos afetam de 1 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (CARLIER et al., 2012) e no Brasil, essa ocorrência afeta de 3 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (LAGO et al., 2007). Em Minas Gerais há alta prevalência da infecção congênita, cerca de 13 casos a cada 10.000 recém-nascidos, sendo que a desigualdade social está relacionada com as taxas de prevalência da infecção (CARELLOS et al., 2014a; CARELLOS et al., 2014b).

Um estudo realizado em Uberlândia (MG) demonstrou diferenças significantes entre dados obtidos de hospital particular e público no que diz respeito à idade materna, cidade de origem, idade gestacional, número de visitas ao médico durante a gestação, tipo de parto e peso do bebê ao nascer. A soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas pacientes atendidas em hospital público foi de 57,6%, enquanto que naquelas

atendidas em hospital particular foi de 41,9%. Além disso, a frequência de toxoplasmose congênita obtida a partir da detecção de anticorpos IgM e/ou IgG específicos anti-*T. gondii* em amostras de cordão umbilical foi exclusivamente observada nas amostras obtidas a partir de pacientes atendidas em hospital público (0,8%) enquanto que nenhuma amostra positiva foi observada a partir de pacientes atendidas em hospital particular (0%), demonstrando ainda diferenças entre populações de níveis sócio-econômicos distintos (SEGUNDO et al., 2004a; 2004b).

Estima-se que, mundialmente, de cada 1000 nascimentos, 3 – 8 bebês são infectados intra-uterinamente e a prevalência de mulheres, em idade gestacional, soropositivas para *T. gondii* é de 15% nos Estados Unidos, 58% na Europa Central, 51 – 72% na América Latina e 54 – 77% em países do Oeste Africano. Baixa soroprevalência, 4 - 39%, foi relatado no Sudoeste da Ásia, China e Coreia, bem como em áreas de clima frio, como os países escandinavos (11 - 28%) e nos EUA 15% das mulheres em idade reprodutiva são soropositivos (TENTER et al., 2000; JONES et al., 2001b).

As manifestações clínicas da toxoplasmose são bastante variadas, desde miocardite, toxoplasmose ocular (retinocoroidite, coroidite), encefalite e até mesmo doenças mentais (hidrocefalia) (MORDUE et al, 1999). Porém, as doenças clínicas devido a toxoplasmose não são comuns porque o estágio de taquizoíta (multiplicação rápida), que é responsável pela destruição tecidual e consequente manifestação clínica, é bem controlado pelo sistema imune do hospedeiro. Já a infecção por bradizoítos é latente e, assim, não gera nenhuma doença clínica aparente (BLADER et al., 2015).

No entanto, o parasito atrai considerável atenção médica e científica por provocar doença grave em indivíduos imunocomprometidos, principalmente em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Nesses pacientes, a

reativação dos parasitos leva ao desenvolvimento da toxoplasmose e a replicação de *T. gondii* acontece de forma descontrolada, o que provoca danos cerebrais, caracterizados por abscessos e áreas de necrose, com risco de morte. Ao contrário, em indivíduos saudáveis, o parasito é controlado pelo sistema imune e permanece em estado latente podendo, em casos raros, causar uveíte (YAROVINSKY, 2014).

Além dos indivíduos imunocomprometidos, nos quais ocorre a conversão dos bradizoítas em taquizoítas, existe outro grupo de risco que se destaca, sendo ele as mulheres gestantes, nas quais a infecção por *T. gondii* durante a gestação pode provocar a infecção congênita do feto que, por sua vez, não apresenta um sistema imune maduro, facilitando a replicação descontrolada dos taquizoítos (BLADER et al., 2015) podendo, inclusive levar o feto a óbito.

1.4. Toxoplasmose congênita e resposta imunológica

Infecções parasitárias congênitas são resultantes da transmissão de parasitos vivos da mulher gestante infectada para o feto os quais persistem após o nascimento. A transmissão pode ocorrer antes do nascimento, no útero (transmissão pré-natal) ou no momento do parto, transmissão perinatal. Tal definição exclui a transmissão de parasitos pós-natal, principalmente a partir do leite materno durante a amamentação, transmissão de parasitos mortos, DNA do parasito ou mesmo moléculas liberadas pelo parasito na mãe e que são prováveis de serem encontradas no sangue fetal. Em uma conotação mais ampla, o termo transmissão vertical corresponde à transmissão materno-fetal de uma geração para outra e inclui transmissão pré-natal, perinatal e, também, rotas de transmissão pós-natal (CARLIER et al., 2012).

As mulheres gestantes representam uma população imunologicamente única uma vez que o sistema imunológico das mesmas é influenciado por sinais originários da

placenta, a qual funciona como um órgão imunomodulador, regulando as respostas imunes das células presentes tanto no sítio de implantação quanto sistemicamente. Entretanto, essa modulação não é supressora, mas protetora, pois, geralmente, o sistema imune materno é bem preparado para controlar infecções garantindo, assim, a sobrevivência do feto (PRABHUDAS et al., 2015).

A patogenia da toxoplasmose em humanos é complexa quando a primeira infecção ocorre durante a gestação, sendo que a infecção congênita acarreta, em aproximadamente 30% dos casos, danos cerebrais ou oculares para o feto com aumento da gravidade dependente da idade gestacional, uma vez que as chances de transmissão do parasito aumentam com o avanço da gestação (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) e da prevenção materna (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011a).

A infecção dos tecidos placentários pode resultar em placentite e pode levar a uma infecção subsequente das células trofoblásticas, que são o conjunto de células externas da blástula que dará origem ao sinciciotrofoblasto que, por sua vez, irá fazer parte da placenta (ABBASI et al., 2003) sendo que esse processo acarreta duas consequências principais: primeiro que a infecção placentária pode afetar negativamente o equilíbrio tênue da interface materno-fetal e segundo que a placenta pode estar diretamente envolvida na transmissão do parasito para o feto, tornando-se alvo terapêutico e diagnóstico (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011a).

No microambiente imune da interface materno-fetal ocorre um balanço Th1/Th2 que exerce influência crucial no desenvolvimento fetal, desempenhando uma importante função na manutenção de uma gestação normal, cujo perfil favorável de resposta imune é o Th2, sendo assim, alterações nesse balanço podem prejudicar a gestação levando ao aborto e fetos natimortos (DEALTRY; O'FARRELL; FERNANDEZ, 2000; ABOU-BACAR et al., 2004).

A citocina IFN- γ produzida pelas células Natural Killer (NK) ou pelos linfócitos citotóxicos CD8⁺ controla diretamente tanto a invasão dos monócitos e, conseqüentemente das células trofoblásticas pelo *T. gondii*, quanto à replicação do parasito nas células infectadas. A liberação exacerbada de IFN- γ possui efeitos imunopatológicos tais como apoptose de células decíduais e dilatação da artéria espiral (SENEGAS et al., 2009). Além disso, a secreção de IFN- γ provoca alta expressão das moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 na superfície dos trofoblastos aumentando a adesão dos monócitos infectados na superfície das células trofoblásticas, assim, essas células perdem a habilidade para apoptose, o que resulta na persistência do parasito nos tecidos placentários (PFAFF; CANDOLFI, 2008) os quais podem tornar-se um reservatório para a infecção congênita imediata ou tardia.

As células trofoblásticas humanas produzem IL-10 e TGF- β (ENTRICAN, 2002) que promovem respostas imunes de perfil Th2 para assegurar a tolerância materno-fetal, por outro lado, tal produção induz aumento significativo da invasão e replicação intracelular de *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008). Porém, esses mecanismos imunomoduladores são essenciais para compensar a produção de citocinas Th1 pró-inflamatórias induzidas por *T. gondii* e podem evitar a perda fetal, especialmente quando a infecção ocorre nas fases precoces da gestação (ZHANG et al., 2012a).

O efeito da infecção congênita e o seu grau de acometimento dependerão de vários fatores, como a interação entre o parasito e o hospedeiro, a virulência da cepa, o número de organismos envolvidos (parasitemia), a via de infecção, a capacidade de resposta imune (humoral e celular) do hospedeiro, bem como idade e características genéticas, a integridade das mucosas e das barreiras epiteliais, a idade gestacional na qual a infecção ocorreu e o estágio de maturidade do sistema imune do feto acometido (RORMAN et al., 2006).

Além disso, nos últimos anos, estudos têm sido direcionados para os fatores de virulência de *T. gondii*, os quais regulam, em parte, as respostas imunes do hospedeiro a partir de secreção de proteínas efetoras dentro da célula hospedeira durante a invasão (HUNTER; SIBLEY, 2012).

1.5. Mastócitos na gestação e infecção

Além de todos os mecanismos imunológicos envolvidos na defesa contra patógenos e, ao mesmo tempo, na manutenção da gestação, os mastócitos, que são um tipo celular de alta plasticidade, também estão envolvidos nesses processos e têm função de sentinelas da imunidade inata e adaptativa, desempenhando funções similares durante a gestação e em diferentes condições fisiopatológicas (KUMAR; SHARMA, 2010), por meio da liberação de materiais biologicamente ativos (revisado em CSABA, 2015).

Devido a sua localização, sob a superfície epitelial, essas células funcionam como sentinelas nos casos de infecções bacterianas ou parasitárias, bem como na detecção de danos celulares (LUNDERIUS-ANDERSSON et al., 2012; MATSUGUCHI, 2012). Além das suas funções na proteção contra os estímulos ambientais, os mastócitos também estão envolvidos nas doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes (SECOR et al., 2000; CHEN et al., 2001; LEE et al., 2002).

No útero e placenta, são encontradas grandes quantidades de mastócitos (PURCELL; HANAHOE, 1991), sendo que na gestação a densidade dos mastócitos é maior do que no estado não gestante (GARFIELD et al., 2006).

Além disso, estudos demonstraram que a desgranulação dos mastócitos está relacionada com o processo de angiogênese no cérvix uterino de ratos durante a gestação (VARAYOUD et al., 2004) além de estar associada com a expressão de mRNA para o fator de crescimento endotelial vascular (VEG-F) (BOSQUIAZZO et al.,

2007) e esse processo ocorre regularmente em associação com alterações clínicas do endométrio de fêmeas adultas e, também, durante a implantação e subsequente placentação (HERYANTO; ROGERS, 2002).

Muitos mediadores podem ser produzidos pelos mastócitos, dentre eles TNF, TGF- β , MIP-1 α (CCL3), VPF/VEGFd, FGF-2d, LIF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF, MCP-1 (CCL2), IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-25 entre outros, e vários desses produtos, inclusive TGF- β , IL-4 e histamina podem ter efeitos anti-inflamatórios e/ou regular negativamente aspectos da resposta imune adquirida (GALLI et al., 2005). Por outro lado, os mediadores inflamatórios aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos locais e o recrutamento de células efectoras para o sítio de infecção (SECOR et al., 2000; CHEN et al., 2001; LEE et al., 2002).

A histamina e a serotonina liberadas a partir dos mastócitos uterinos controlam a função cervical (BYTAUTIENE et al., 2002) e influenciam na contratilidade do miométrio (RUDOLPH et al., 1993), o que já foi comprovado por estudos *in vitro* realizados em fragmentos desse tecido (BYTAUTIENE et al., 2004). Estudos anteriores sugerem que a histamina dos mastócitos seja importante para a ovocitação normal e implantação do blastocisto (SZELAG; MERWID-LAD; TROCHA, 2002a), agindo por meio de receptores H1 de histamina (SZELAG; MERWID-LAD; TROCHA, 2002b).

Além disso, uma vez ativados, os mastócitos desgranulados podem rapidamente liberar diversas proteases específicas de mastócitos, como quimases, triptases, carboxipeptidases (PEJLER et al., 2010; TRIVEDI; CAUGHEY, 2010; CAUGHEY, 2011; LUNDEQUIST; PEILER, 2011) e proteoglicanas (STEVENS; ADACHI, 2007).

As quimases são serinas peptidases expressas e secretadas principalmente por mastócitos e acredita-se que elas desempenhem uma ampla variedade de funções na

defesa do hospedeiro, homeostasia e doenças, inclusive nas defesas anti-parasitárias (KNIGHT et al., 2000), regulação da pressão sanguínea (JU et al., 2001; LI et al., 2004), remodelamento do tecido conjuntivo (TCHOUGOUNOVA et al., 2005), angiogênese (COUSSENS et al., 1999), remodelamento cardiovascular (NISHIMOTO et al., 2001), lesão por isquemia (ABONIA et al., 2005), fibrose pulmonar (SAKAGUCHI et al., 2004), inflamação das vias aéreas (de GARAVILLA et al., 2005; GRECO et al., 2007) e desintoxicação de veneno (METZ et al., 2006).

A maioria das quimases podem clivar uma variedade de peptídeos extracelulares e proteínas, inclusive alvos endógenos como a angiotensina I e patógenos exógenos ou alvos derivados de alérgenos como as profilinas (MELLON; FRANK; FANG, 2002). Uma vez que, no hospedeiro, há uma vasta quantidade de alvos e organismos patogênicos cliváveis, as quimases têm o potencial de influenciar uma diversidade de eventos associados com a ativação e, consequente secreção, dos mastócitos (CAUGHEY et al., 2008).

Os humanos expressam apenas uma quimase específica de mastócitos, portanto, só há um gene para as quimases até então identificado, o qual pertence à família- α . Ao contrário, existem 13 genes de quimases conhecidos para camundongos (GALLWITZ; HELLMAN, 2006), portanto, os roedores expressam uma variedade de genes para as β -quimases, designados de protease 1 de mastócitos (mMCP-1), mMCP-2 e mMCP-4, bem como para uma α -quimase, mMCP-5 (BROWN et al., 2003).

As diversas quimases diferem de modo significativo com relação à distribuição tecidual. Os mastócitos de tecido conjuntivo estão localizados em vários tecidos, como pele, língua e peritônio e expressam, predominantemente, mMCP-4 e mMCP-5, enquanto que os mastócitos de mucosa estão localizados no trato intestinal e, alternativamente, expressam mMCP-1 e mMCP-2 (BROWN et al., 2003).

Com base na distribuição tecidual, propriedades de ligação com a heparina, substrato e especificidade de clivagem, a protease 4 de mastócito (MCPT4), que é uma β -quimase, é funcionalmente homóloga à quimase humana (TCHOUGOUNOVA; PEJLER; ABRINK, 2003; ANDERSSON; KARLSON; HELLMAN, 2008).

Os mastócitos também influenciam nos abortos precoces, uma vez que, nesses casos, a decídua apresenta aumento significativo na quantidade desse tipo celular (MARX et al., 1999) e, provavelmente, esse efeito seja controlado por secreção de citocinas. Deste modo, os mastócitos possuem um duplo papel no sistema reprodutivo uma vez que, nos estágios iniciais da gestação (COCCHIARA et al., 1996; MARX et al., 1999) eles auxiliam na implantação do blastocisto e regulação do fluxo sanguíneo (SZELAG; MERWID-LAD; TROCHA, 2002a), enquanto que nos estágios tardios eles podem provocar um parto prematuro (WOIDACKI; JENSEN; ZENCLUSSEN, 2013).

1.6. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

Para que os linfócitos T reconheçam os antígenos associados às células hospedeiras, esses devem ser apresentados às células TCD4⁺ e TCD8⁺ e essa apresentação é realizada por moléculas (proteínas especializadas) que são expressas na superfície das células hospedeiras, codificadas por um gene denominado complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que está presente em todas as espécies de mamíferos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Em camundongos, o MHC foi descoberto a partir de estudos de transplantes de tecidos e o locus específico está ligado a um gene no cromossomo 17 que codifica um antígeno de grupo sanguíneo denominado antígeno II, portanto, esta região genética foi chamada de histocompatibilidade-2 ou H-2. Nos humanos, o MHC foi descoberto a partir da procura de moléculas de superfície celular específicas de um indivíduo e que

são estranhas a outro indivíduo e foi, então, denominado antígeno leucocitário humano (HLA) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As respostas imunes desenvolvidas contra a toxoplasmose são caracterizadas por uma forte resposta de perfil Th1 com ativação das populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ específicos contra o parasito e consequente produção de IFN- γ , que é a citocina inflamatória chave na imunidade protetora anti-*T. gondii* (SUZUKI et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1991; DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

Dentro das células do hospedeiro, algumas bactérias e parasitos habitam compartimentos especializados, como o fagossoma modificado da *Mycobacterium tuberculosis* e o vacúolo parasitóforo de *T. gondii*. Essa localização é uma tentativa de impedir que o material microbiano entre na via de vigilância do MHC classe I (MHC-I) (BLANCHARD; SHASTRI, 2010).

Apesar disso, durante a infecção por *T. gondii* há o reconhecimento de peptídeos específicos por meio de moléculas do MHC-I pelas células TCD8⁺ (CONG et al., 2012), que são as principais células do sistema imune contra a sobrevivência de tumores e patógenos intracelulares (BLANCHARD; SHASTRI, 2010), levando a uma resistência ao *T. gondii* em modelos murinos (CONG et al., 2012).

O receptor de antígeno das células T (TCR) nas células TCD8⁺ reconhecem pequenos peptídeos que são apresentados pelas moléculas do MHC-I na superfície das células tumorais ou infectadas. Os produtos de degradação de proteínas intracelulares próprias ou codificadas por patógenos constituem uma importante fonte de peptídeos para via de apresentação pelo MHC-I que após o reconhecimento induzem os linfócitos TCD8⁺ citotóxicos a produzirem citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (BLANCHARD; SHASTRI, 2010).

A ativação das células TCD4⁺ requer o processamento e apresentação de antígenos pelas moléculas do MHC classe II (MHC-II) (JANEWAY, 2001), no entanto, durante a infecção por *T. gondii*, o parasito manipula a apresentação de antígenos pelo MHC-II (LUDER et al., 1998; LUDER et al., 2001; MCKEE et al., 2004) inibindo a transcrição desses genes e sua expressão nas células infectadas, diminuindo assim as respostas das células TCD4⁺ do hospedeiro (LUDER et al., 2003; LANG et al., 2006).

As células da placenta possuem uma capacidade única de selecionar genes específicos dentro do MHC, entre os quais está o HLA-G que pode ser responsável por uma reprogramação das respostas imunes maternas locais para promover a tolerância materno-fetal e, durante a infecção por *T. gondii*, contribuir no contrabalanço das respostas imunes Th1 citotóxicas (HUNT et al., 2005).

A forte expressão de HLA-G nas células trofoblásticas pode inibir a lise por células NK maternas e pode mediar a supressão das respostas das células T alocitotóxicas contra o feto. Além disso, a expressão de HLA-G também conduz os fagócitos mononucleares para uma via supressora (HUNT et al., 2005).

Os níveis de HLA-G solúveis (sHLA-G) são maiores em fluidos amnióticos provenientes de mulheres gestantes que adquiriram a infecção por *T. gondii* durante a gestação do que nas mulheres gestantes não infectadas e maiores também nos fetos que sofreram a infecção congênita comparado aos fetos sem a infecção congênita. Isso sugere que o sHLA-G participa da imunomodulação necessária para impedir a perda fetal durante a infecção por *T. gondii*, uma vez que a diminuição dessas formas está correlacionada com a perda fetal, embora uma alta expressão poderia favorecer a transmissão congênita (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011b).

Algumas proteínas solúveis do parasito inibem a expressão de moléculas de MHC-II induzidas por IFN- γ na superfície das células infectadas, sugerindo que essas

proteínas excretadas/secretadas desempenhem atividade imunomoduladora a partir da inibição da expressão do MHC-II e redução da expressão e liberação de TNF- α pelos macrófagos (LEROUX et al., 2015a). Além da regulação transcricional de MHC-II, o parasito controla a expressão de componentes importantes na via de apresentação de antígenos por MHC-II, tais como a cadeia invariante associada ao MHC-II (I $_i$ ou CD74) e o peptídeo H2-DM, em células apresentadoras de antígeno profissionais (LEROUX et al., 2015b).

Estudos prévios envolvendo camundongos BALB/c (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b) e as linhagens congênicas CB10-H2 (H-2^b) e C57BL/KsJ (H-2^d) demonstraram que as linhagens de camundongos que expressam o haplotipo “d” são mais resistentes a infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* do que camundongos que expressam o haplotipo “b” (RESENDE et al., 2008).

Nossos resultados anteriores demonstraram que camundongos BALB/c apresentaram 50% de perda embrionária/fetal sob a infecção com *T. gondii* no início da gestação e que camundongos C57BL/6 se mostraram mais suscetíveis, com 90% de perda embrionária/fetal, infectados nas mesmas condições (COUTINHO et al., 2012).

Além disso, estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de desenvolvimento de vacinas contra *T. gondii*, sendo elas baseadas em peptídios derivados de epítomos de células TCD8⁺ restritos ao HLA os quais exibem alta afinidade de ligação e induz a liberação de IFN- γ a partir das células mononucleares de pessoas infectadas com *T. gondii* (CONG et al., 2012).

Sendo assim, sabendo que a infecção por *T. gondii* durante a gestação acarreta comprometimento fetal ou provoca morte do feto no útero e aborto espontâneo e que os mecanismos envolvidos não são bem elucidados, nosso trabalho teve como objetivo verificar a influência do haplotipo do MHC no resultado da gestação em camundongos

congênicos CB10H2, (mesmo “background” genético do BALB/c e haplotipo do MHC H-2^b) e C57BL/KsJ, (mesmo “background” genético do C57BL/6 e haplotipo do MHC H-2^d) infectados por *T. gondii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho experimental foi verificar a influência do haplotipo do MHC na suscetibilidade de camundongos congênicos CB10-H2 (mesmo “background” genético do BALB/c e haplotipo do MHC H-2^b) e C57BL/KsJ (mesmo “background” genético do C57BL/6 e haplotipo do MHC H-2^d) frente à infecção congênita por *T. gondii*, adquirida no início da gestação.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o índice de aborto/reabsorção fetal em fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias pós infecção;
- Quantificar o parasitismo tecidual no útero/placenta, bem como no pulmão e cérebro de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias pós infecção;
- Analisar o processo inflamatório no útero/placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias pós infecção;
- Caracterizar o perfil sistêmico e *in situ* de citocinas, assim como a expressão de mRNA para *cma1*, *mctp4* e *Foxp3* no útero/placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias pós infecção;

- Verificar a presença de mastócitos totais, granulados e desgranulados no útero/placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias após a infecção;
- Avaliar os níveis dos isotipos de imunoglobulinas específicas para *T. gondii* no soro de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias de infecção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação

O presente estudo utilizou camundongos de 8 - 12 semanas de idade das linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ, que foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Centro de Pesquisa René Rachou – Belo Horizonte/MG e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada.

3.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O desenvolvimento do experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo de número 046/12 (ANEXO I).

3.3. Organismos infecciosos

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em roedores *Calomys callosus*, os quais foram inoculados por via oral com 20 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro foi removido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, estéril, pH 7.2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. Os cistos cerebrais foram contados sob microscopia de luz utilizando uma objetiva de 10x de aumento e utilizados para a infecção dos animais (BARBOSA et al., 2007).

3.4. Acasalamento e detecção de prenhez

Fêmeas virgens foram acasaladas com machos das suas respectivas linhagens na proporção de duas fêmeas para cada macho até completarmos um mínimo de cinco

animais para cada grupo experimental. Todos os dias, pela manhã, as fêmeas foram observadas para verificar se havia presença da rolha vaginal (mistura de sêmen com secreção vaginal). O dia da detecção desse sinal foi considerado como o primeiro dia de gestação.

As fêmeas com presença da rolha vaginal foram separadas e infectadas por via oral no 1º dia de gestação com *T. gondii* distinguindo dois grupos experimentais, um grupo foi sacrificado aos oito dias de gestação e infecção (8dG/8dI) e o outro aos dezoito dias de gestação e infecção (18dG/18dI).

Grupos controles também foram avaliados sendo estes compostos por fêmeas não gestantes e não infectadas (NG/NI), bem como gestantes não infectadas com oito (8dG/NI) e dezoito dias de gestação (18dG/NI), assim como fêmeas não gestantes e infectadas analisadas aos oito (NG/8dI) e dezoito (NG/18dI) dias após a infecção.

3.5. Infecção experimental, coleta e processamento do material

Após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, considerado como primeiro dia de gestação, as fêmeas gestantes foram oralmente inoculadas com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* diluídos em 200 µl de PBS. No dia da eutanásia das fêmeas, de acordo com cada grupo experimental, as fêmeas foram anestesiadas com Cetamine (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazine (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009) e o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital. Após a retração do coágulo, o soro foi segregado por centrifugação do sangue durante 5 minutos a 500 x g e mantido a -80 °C até o momento do uso.

As fêmeas foram, então, eutanasiadas por deslocamento cervical e o pulmão, cérebro útero e placenta foram coletados e acondicionados de acordo com a finalidade experimental.

Quando o útero das fêmeas gestantes foi removido, os mesmos foram documentados quanto aos sítios de implantação/reabsorção. A porcentagem de aborto foi calculada como a razão entre os sítios de reabsorção (ausência de embrião/feto em animais onde se detectou a rolha vaginal anteriormente), pelo total de sítios de implantação (sítios de reabsorção mais sítios de implantação) como previamente descrito (JOACHIM et al., 2001; ZENCLUSSEN et al., 2002; SHIONO et al., 2007).

Para microscopia de luz, pulmão, cérebro, útero e placenta foram coletados e fixados em formol tamponado 10% ou Carnoy e posteriormente incluídos em parafina.

Para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), fragmentos de tecidos materno/embrionários ou materno/fetais foram coletados, lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS), acondicionados em tubos eppendorf e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até o momento do uso.

3.6. Análises histológicas

Para análises das alterações histológicas, útero e placenta foram fixados em formol tamponado 10%, processados para inclusão em parafina e os cortes histológicos foram confeccionados. Os cortes teciduais de $4\mu\text{m}$ de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisados em microscópio óptico.

Foi avaliada a infiltração de leucócitos no útero e placenta e no útero foi observada a infiltração de células inflamatórias e presença de necrose nos sítios de implantação. Todas as análises foram feitas em dois cortes histológicos por camundongo, em pelo menos 5 fêmeas por grupo, com a objetiva de 40x de aumento, em ensaio duplo cego.

Além disso, cortes histológicos de útero e placenta fixados em Carnoy foram corados com Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos por microscopia de

luz, que foi realizada em 35 campos microscópicos utilizando uma objetiva de 40x de aumento. Tais cortes foram avaliados quanto à presença de mastócitos granulados e/ou desgranulados.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas, imersas em água corrente e destilada durante 10 e 5 minutos, respectivamente e mergulhadas em tampão fosfato citrato pH 3.0 durante cinco minutos. Feito isso, as lâminas foram imersas em Azul de Toluidina 0,5% em tampão fosfato citrato pH 3.0 durante três minutos e lavadas em tampão fosfato citrato pH 3.0 para retirar o excesso do corante (diferenciação). Na sequência as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

3.7. Imunohistoquímica para detecção de parasitos

O parasitismo tecidual foi avaliado no pulmão, cérebro, útero e placenta por imunohistoquímica como previamente descrito (BENEVIDES et al., 2008). Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6.0, em forno microondas e os sítios não específicos foram bloqueados por incubação dos cortes com leite desnatado 0,3% (Molico - Nestlé). Feito isso, os cortes foram incubados durante a noite toda, com soro de *C. callosus* anti-*T. gondii* diluído em saponina 0,01% (1:100) e, posteriormente, com IgG de cabra anti camundongo biotinilada (Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.). A reação foi amplificada usando o sistema ABC (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) e desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em

microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e estruturas como cistos presentes em 35 campos microscópicos no útero/placenta e em 100 campos no pulmão e cérebro. As análises foram feitas utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em 2 secções teciduais por camundongo e no mínimo 5 fêmeas por grupo experimental.

3.8. Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para CMA1, MCPT4, FOXP3, SAG-1, IL-13, IL-10, TGF- β , IL-17 IFN- γ e TNF no útero e placenta dos animais experimentais.

3.8.1. Extração de mRNA e confecção do DNA complementar

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Life Technologies, Carlsbad, USA). Brevemente, para cada amostra, foi adicionado o reagente Trizol (1 mL para 100 mg de tecido), agitando por 30 segundos e deixando à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 mL da suspensão foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (500 μ l) foi transferida para outro tubo eppendorf e foi adicionado 0,5 mL de isopropanol gelado, com posterior agitação em “vortex” e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguido de nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por inversão e ao *pellet* foram adicionados 950 μ l de etanol 75% seguido de agitação em “vortex” e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi cuidadosamente removido por inversão e os *pellets* foram ressuspensos em água de injeção e armazenado a -80° C. Alíquotas de 2 μ l de cada amostra, diluídas em 98 μ l de água de injeção (fator de diluição de 50X) foram utilizadas

para a obtenção da concentração de RNA/ μ L nas amostras determinadas usando o aparelho GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare).

A reação para confecção do cDNA foi realizada utilizando RNA (5ng/ μ L) e oligo (dT) primer (Promega, Fitchburg, EUA) diluídos em água de injeção. A mistura foi aquecida a 70 °C durante 5 minutos em termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific) e depois foram adicionados 11,5 μ L de uma solução contendo um tampão, MgCl₂, dNTPs, a enzima transcriptase reversa (Promega) e água de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Em seguida, a mistura final foi incubada a 42 °C por 1 hora no mesmo termociclador. Por fim, foram adicionados 17,5 μ L de água de injeção e as amostras foram acondicionadas a -20 °C até o momento do uso.

3.8.2. Quantificação das mensagens por reação de PCR quantitativa (qPCR)

Para a reação de qPCR, as amostras (2 μ L) foram misturadas com SYBR (SYBR® Select Master Mix, Applied Biosystems) e 0,15 pMol/ μ L de cada primer (Tabela 1) até o volume final de 10 μ L por reação. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para GAPDH utilizado como controle positivo da reação de amplificação e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados.

A reação foi realizada utilizando 40 ciclos com temperatura de anelamento a 62 °C por 2 minutos desenvolvida em aparelho de qPCR ABI7500 (Life Technologies). A análise dos resultados foi feita pelo método do delta-delta Ct (LIVAK, SCHMITTEN, 2001).

Tabela 1. Lista das sequências dos primers utilizados para os ensaios de expressão gênica por qPCR.

Nome do gene	Sequências do Primers
GAPDH	GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG CAGTGTAGCCCAAGATGCCC
IFN- γ	GGCTGTTTCTGGCTGTTACTGC CATCCTTTTGCCAGTTCCTCC
IL-17a	CCACCGCAATGAAGACCCT GCTTTCCTCCGCATTGAC
IL-13	GAGCAACATCACACAAGACCAGA GAATCCAGGGCTACACAGAACC
IL-10	TTTAAGGGTTACTTGGGTTGCC CGCATCCTGAGGGTCTTCA
TGF- β	ACCGCAACAACGCCATCT AGTCTGTAAGCCCTTCGTCAC
TNF	CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG GATCTGAGTGTGAGGGTCTGGG
FOXP3	AGAATGCCATCCGCCACA CACACTGCTCCCTTCTCGCT
SAG-1	TTTCCGAAGGCAGTGAGACG CCATAACGCCACATCGCA
CMA-1	TACAGACAGGCCAGATCGCAT TTGCCAGCCTGTGAGGAAA
MCPT-4	GAAGTGAAAAGCCTGACCTGC CATGCTTTGTTGAACCCAAGG

3.9. Mensuração de citocinas no soro dos animais experimentais por “Cytometric Beads Array” (CBA)

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A foram quantificadas pelo método “cytometric beads array assay” (CBA) (BD, San Jose, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram adquiridas usando o aparelho FACSCanto II Flow Cytometer (BD, Biosciences, México) e analisadas pelo FCAPARRAYTM Software - versão 3.0 BD Biosciences – San Jose, CA – USA.

3.10. Detecção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii*

Para confirmar a soroconversão dos animais, foi realizado um imunoenensaio enzimático (ELISA) indireto para detectar a presença de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicas anti-*T. gondii*.

Para a detecção de IgG total específica, placas de microtitulação de poliestireno de baixa afinidade (Kartell SPA, Noviglio, Milão, Itália) foram sensibilizadas durante toda a noite com antígeno solúvel de *T. gondii* a 10 μ g/ml em tampão carbonato 0,06 M, pH 9.6. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS mais Tween-20 0,05% (PBS-T) e incubadas com as amostras de soro de camundongo diluídas na proporção de 1:16 em PBS contendo leite desnatado 5% (PBS-TM) durante 1 hora à 37 °C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com IgG de cabra anti camundongo marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) diluída numa proporção 1:1000 em PBS-TM durante 1 hora à 37 °C. Após novas lavagens, a reação foi desenvolvida com o substrato enzimático que consiste em H₂O₂ 3% e 1 mg/ml de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão fosfato citrato 0,1M, pH 5.0. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2 N e a densidade óptica (DO) foi mensurada a 492 nm, usando um leitor de placa (Versa Max Microplate Reader, Molecular Devices).

3.11. Detecção de isotipos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b específicos anti-*T. gondii*

Para a detecção de IgG1 e IgG2a/IgG2b específicos anti-*T. gondii*, placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar, New York, NY, USA) foram incubadas durante toda a noite a 4 °C com antígeno solúvel de *T. gondii* (10 µg/ml), lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-TM durante 1 hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com as amostras de soro de camundongo diluídas na proporção de 1:10 em PBS-TM e incubadas durante 2 horas a 37 °C. As subclasses de IgG foram detectadas com anticorpos secundários de cabra anti-IgG1 ou anti-IgG2a ou anti-IgG2b de camundongo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) diluídos numa proporção de 1:250 em PBS-TM e incubados durante 2 horas a 37 °C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com IgG de coelho anti-cabra marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) diluído numa proporção de 1:10.000 em PBS-TM e incubadas durante 30 minutos a 37 °C. Após novas lavagens, a reação foi desenvolvida com 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS) 0,01 M (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) e H₂O₂ 3% e a DO foi determinada a 405 nm. Os resultados foram expressos pelo índice ELISA (IE) como se segue: IE = DO da amostra, onde o corte foi estabelecido como a média dos valores da DO dos soros do controle negativo mais 3 desvios padrão. Baseado em testes de rotina realizados com soros controles negativos e positivos, valores de IE > 1.0 foram considerados resultados positivos.

3.12. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) dos grupos experimentais. A comparação de dados entre as linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ foi analisada pelo teste *t* de *Student*, enquanto que a comparação entre as diferentes condições experimentais foi analisada pelo teste ANOVA (*Two-Way*) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. A comparação do índice de aborto entre as linhagens foi analisada pelo teste exato de Fischer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.13. Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos, incluindo a coleta do material biológico, utilização dos reagentes e dos equipamentos, bem como manuseio e conduta com os animais foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4. Resultados

4.1. Índice de reabsorção fetal frente à infecção por *T. gondii*

Neste trabalho, nós investigamos se os danos gestacionais que ocorrem durante a gestação e infecção por *T. gondii* poderiam sofrer influência do haplotipo do MHC e, para isto, nós avaliamos os resultados gestacionais em fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas pelo parasito.

Foi possível observar que 100% das fêmeas, tanto CB10-H2 quanto C57BL/KsJ, não infectadas apresentaram sítios de implantação aos 8 dias de gestação (Figura 3A) e fetos no útero aos 18 dias de gestação (Tabelas 2 e 3).

Por outro lado, 40% das fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de gestação e infecção (8dG/8dI) apresentaram embriões no útero sendo que todos eles apresentavam aspecto hemorrágico (Tabela 3). Quanto ao grupo das fêmeas C57BL/KsJ, 33% das fêmeas apresentaram embriões no útero aos 8dG/8dI e eles apresentavam tanto aspectos normais (Tabela 3) quanto hemorrágicos (Tabela 3, Figura 3B).

Isto é, houve uma taxa de reabsorção fetal/aborto de 60% entre as fêmeas CB10-H2 e de 67% entre as fêmeas C57BL/KsJ. Além disso, o útero de algumas fêmeas C57BL/KsJ aos 8dG/8dI apresentou-se bastante espesso e vascularizado.

Aos 18 dias de gestação e infecção (18dG/18dI) somente 20% das fêmeas CB10-H2 apresentaram fetos no útero sendo eles tanto normais quanto hemorrágicos (Tabelas 2 e 3; Figura 3C), enquanto que nenhuma das fêmeas C57BL/KsJ apresentaram fetos aos 18dG/18dI (Tabelas 2 e 3). Ou seja, aos 18dG/18dI os índices de reabsorção fetal/aborto foram de 80% e 100% para CB10-H2 e C57BL/KsJ, respectivamente.

Nossos resultados sugerem que a infecção por *T. gondii* afeta o processo gestacional tanto nos estágios precoces (8dG/8dI) quanto nos estágios tardios (18dG/18dI) da gestação e que os danos gestacionais observados foram similares para

ambas as linhagens de camundongos, uma vez que não houve diferença significativa quando os índices de aborto foram comparados entre as linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ.

Tabela 2. Presença de fetos no útero e índice de reabsorção fetal em fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas por via oral com cinco cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias de gestação, bem como fêmeas controles com 8 ou 18 dias de gestação não infectadas.

Linhagem		Grupos Experimentais			
		8dG		18dG	
		8dI	NI	18dI	NI
CB10-H2	Média de sítios normais ^a	0	3,4	0,8	4,8
	Média do total de sítios de implantação ^b	1,4	3,8	1,4	8,2
	Número de fêmeas com sítios de implantação/número de fêmeas com presença da rolha vaginal	2/(5)	5/(5)	1/(5)	5/(5)
C57BL/KsJ	Média de sítios normais ^a	1,4	6,4	0	6,4
	Média do total de sítios de implantação ^b	1,4	6,4	0	7
	Número de fêmeas com sítios de implantação/número de fêmeas com presença da rolha vaginal	2/(6)	4/(5)	0/(5)	5/(5)

Após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, fêmeas consideradas gestantes foram oralmente inoculadas com cinco cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no primeiro de gestação. As fêmeas foram divididas em dois grupos experimentais, sendo um grupo sacrificado aos 8 dias de gestação/infecção e o outro aos 18 dias de gestação/infecção e analisadas quanto ao índice de aborto. O número entre parênteses indica o número de fêmeas por grupo. ^aMédia de sítios normais calculada como a razão do total de sítios normais para cada grupo pelo número do total de fêmeas de cada grupo. ^bMédia do total de sítios de implantação foi calculada como a razão do total de sítios de implantação (sítios normais + sítios de reabsorção) para cada grupo pelo número do total de fêmeas de cada grupo. Dias de gestação (dG); Dias de infecção (dI); Não gestantes (NG); Não infectadas (NI). Os dados foram estatisticamente analisados pelo teste exato de Fisher.

Tabela 3. Presença de embriões ou fetos no útero em fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas por via oral com cinco cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* no primeiro dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 18 dias de gestação, bem como fêmeas controles com 8 ou 18 dias de gestação não infectadas.

Linhagem	Fêmeas	Número de embriões/Fetos			
		8dG		18dG	
		8dI	NI	18dI	NI
CB10-H2	1	0	1 (N)	4 (N) + 3 (H)	4 (N) + 3 (H)
	2	0	6 (N)	0	4 (N) + 5 (H)
	3	5 (H)	2 (H)	0	10 (N)
	4	2 (H)	1 (N)	0	2 (N) + 4 (H)
	5	0	9 (N)	0	4 (N) + 5 (H)
C57BL/KsJ	1	0	9 (N)	0	6 (N)
	2	0	8 (N)	0	7 (N)
	3	0	0	0	5 (N) + 2 (H)
	4	7 (N)	7 (N)	0	6 (N)
	5	0	8 (N)	0	8 (N) + 1 (H)
	6	7 (H)	-	-	-

Após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, fêmeas consideradas gestantes foram oralmente inoculadas com cinco cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no primeiro de gestação. As fêmeas foram divididas em dois grupos experimentais, sendo um grupo sacrificado aos 8 dias de gestação/infecção e o outro aos 18 dias de gestação/infecção e analisadas quanto ao índice de aborto. O número de embriões ou fetos presentes no útero no momento do sacrifício foi documentado. Dias de gestação (dG); Dias de infecção (dI); Não infectadas (NI); Embriões/Fetos normais (N); Embriões/Fetos hemorrágicos (H).

Figura 3

Figura 3: Fotografia representativa do útero de uma fêmea CB10-H2 aos 8 dias de gestação, não infectada (8dG/NI) com sítios de implantações normais (A); útero de uma C57BL/KsJ aos 8 dias de gestação e infecção (8dG/8dI) com a presença de sítios de implantação hemorrágicos (B); uma fêmea CB10-H2 aos 18 dias de gestação e infecção (18dG/18dI) com a presença de fetos normais (asteriscos brancos) e, também, sítios de implantação hemorrágicos/fetos em processo de reabsorção (setas pretas) (C).

4.2. Análises histológicas do útero/placenta de fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com *T. gondii*

Como foram observados danos gestacionais graves em ambas as linhagens de camundongos, tanto nos estágios precoces quanto nos estágios tardios da gestação após a infecção com *T. gondii*, os úteros e placentas das fêmeas experimentais foram histologicamente analisadas para verificarmos a presença de patologia nesses órgãos.

Aos 8dG/8dI o útero e decídua das fêmeas CB10-H2 apresentaram focos inflamatórios e alguns deles estavam entre a musculatura lisa e o endométrio. Também foram observados grandes números de células polimorfonucleares disseminadas pelo endométrio.

Nessas fêmeas CB10-H2 aos 8dG/8dI, todos os sítios de implantação estavam hemorrágicos e necróticos (Tabela 3) e nesses sítios a decídua próxima ao sítio de implantação estava totalmente necrosada (Figura 4A, seta) e com alguns debris celulares. Além disso, foram observados edemas no parênquima de algumas fêmeas dessa condição experimental (Figura 4B, asteriscos).

Com relação às fêmeas C57BL/KsJ, das seis fêmeas analisadas apenas duas apresentaram embriões no útero aos 8dG/8dI, sendo que uma fêmea apresentou sítios de implantação normais (Tabela 3) enquanto que na outra fêmea, todos os sítios de implantação estavam hemorrágicos (Tabela 3; Figura 3B) .

As fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de infecção, não gestantes (NG/8dI) também apresentaram edema e inflamação no útero (Figura 4C) e algumas das fêmeas CB10-H2 que não apresentaram fetos no útero aos 18dG/18dI, estavam com útero altamente inflamado (Figura 4D).

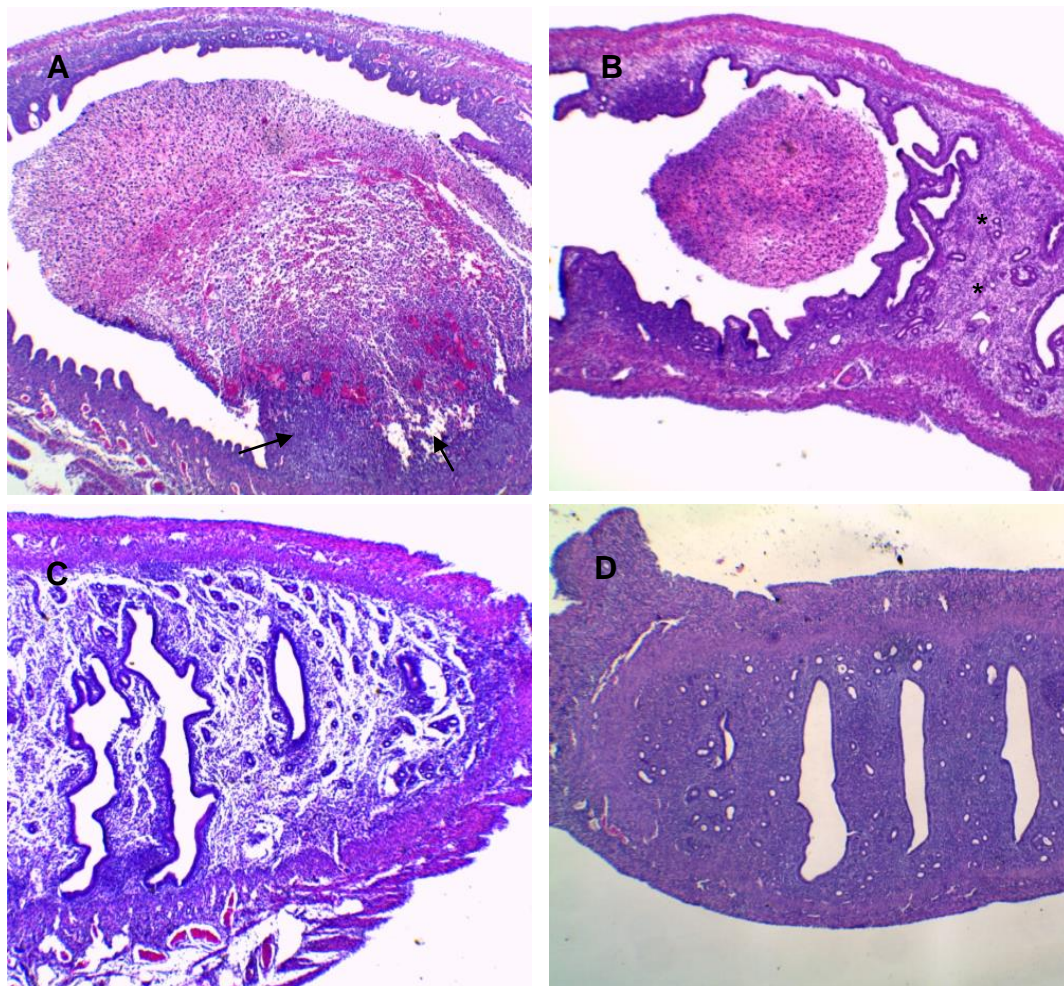
Figura 4

Figura 4. Fotomicrografia representativa das mudanças histológicas no útero e decídua pela coloração de Hematoxilina-Eosina em fêmeas CB10-H2 infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, via oral (A, B, C e D). Útero de fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de gestação e infecção (8dG/8dI) (A, B); útero de uma fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de infecção, não gestante (NG/8dI) (C) e o útero de uma fêmeas CB10-H2 aos 18 dias de gestação e infecção (18dG/18dI) (D). As setas indicam a decídua próxima ao embrião totalmente necrosada (A). Os asteriscos indicam edema no parênquima do útero infectado (B). Dias de gestação (dG); dias de infecção (dI) e fêmeas não gestantes (NG).

4.3. Parasitismo tecidual no útero, placenta, pulmão e cérebro das fêmeas infectadas com *T. gondii*

Como foram observados danos gestacionais nas fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ e danos histológicos no útero das fêmeas CB10-H2, nós avaliamos o parasitismo tecidual nesse órgão para observarmos se a carga parasitária nesse local estaria provocando os danos observados.

O parasitismo tecidual foi analisado por imunohistoquímica no útero e placenta das fêmeas aos 8 e 18 dias infecção por *T. gondii*, gestantes ou não, e não foram observados parasitos nos sítios avaliados em nenhuma linhagem de camundongo. Deste modo, a expressão de mRNA para SAG-1 foi investigada por qPCR e foram detectados níveis mínimos de expressão no útero e placenta (dados não mostrados).

Para obtermos a confirmação da infecção, o parasitismo foi investigado no pulmão e no cérebro, que são os principais sítios de proliferação do parasito (SILVA et al., 2009).

Aos 8 dias de infecção o parasitismo foi aparentemente maior no pulmão das fêmeas C57BL/KsJ do que nas fêmeas CB10-H2, independentemente da gestação (Figura 5A). Já aos 18 dias de infecção, o parasitismo pulmonar foi aparentemente maior nas fêmeas CB10-H2 não gestantes comparadas às fêmeas C57BL/KsJ nas mesmas condições. Por outro lado, aos 18dG/18dI o parasitismo pulmonar parece similar para ambas as linhagens (Figura 5A).

Entre as fêmeas da linhagem CB10-H2, não houve diferença significativa na carga parasitária observada no pulmão entre as diferentes condições experimentais. Em relação às fêmeas da linhagem C57BL/KsJ, estas apresentaram uma diminuição significativa de parasitos dos 8 para os 18 dias de infecção, sendo estatisticamente

significante nos grupos não gestantes ($p<0,05$). Tal fato pode ser atribuído ao estabelecimento da fase crônica da doença (Figura 5A).

No cérebro o parasito foi raramente encontrado aos 8 dias de infecção, independente da gestação, em ambas as linhagens de camundongos. No entanto, aos 18 dias de infecção tanto CB10-H2, quanto C57BL/KsJ apresentaram alta carga parasitária no cérebro, independente da gestação.

Na fase mais tardia da infecção as fêmeas CB10-H2 não gestantes (NG/18dI) apresentaram carga parasitária significativamente maior do que nas fêmeas aos 8 dias de infecção (NG/8dI) ($p<0,05$) (Figura 5B). A carga parasitária nas fêmeas gestantes aos 18 dias de infecção (18dG/18dI) aumentou significativamente com relação às fêmeas aos 8 dias de infecção (8dG/8dI) em ambas as linhagens de camundongos ($p<0,05$) (Figura 5B).

Além disso, aos 18dG/18dI essa carga parasitária foi aparentemente maior do que nas fêmeas não gestantes, aos 18 dias de infecção (NG/18dI) em ambas as linhagens (Figura 5B). Esses dados demonstram que a multiplicação de *T. gondii* ocorreu normalmente no pulmão e no cérebro de ambas as linhagens de camundongos.

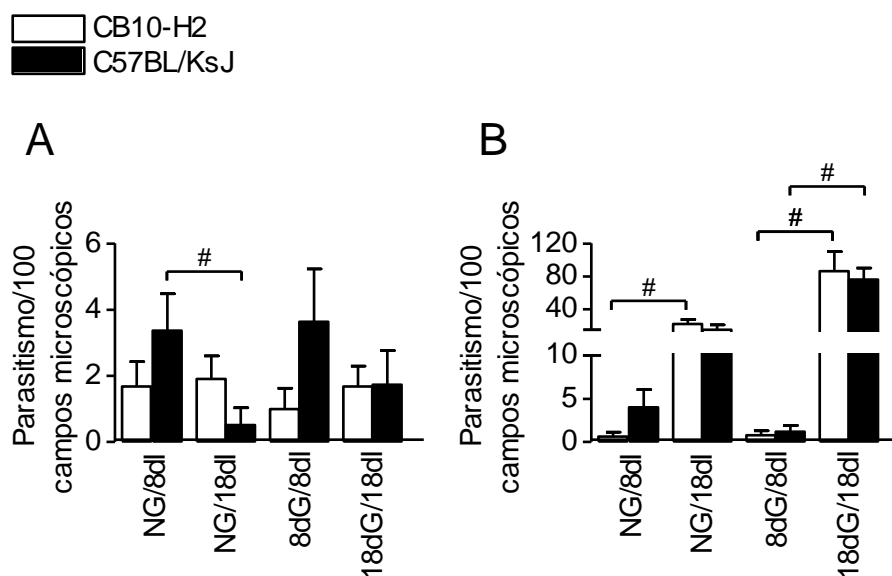
Figura 5

Figura 5. Parasitismo tecidual em fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, por via oral, no primeiro dia de gestação e analisadas aos 8 e 18 dias após infecção (8dG/8dI e 18dG/18dI) e fêmeas aos 8 e 18 dias de infecção, não gestantes (NG/8dI e NG/18dI) como controles. O parasitismo tecidual no pulmão (A) e no cérebro (B) foi detectado por imunohistoquímica e a quantificação foi feita por contagem do número de vacúolos parasitóforos e estruturas como cisto em 100 campos microscópicos dos tecidos pulmonar e cerebral. Os dados são representativos de, pelo menos, dois experimentos independentes (ensaio duplo cego) com, no mínimo, cinco camundongos por grupo, sendo que os resultados foram similares entre ambos os observadores. O teste *t* de Student foi aplicado para determinar a diferença estatística entre as linhagens nas diferentes condições (*), enquanto que as comparações entre as diferentes condições dentro de cada linhagem isoladamente foram analisadas pelo teste ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (#). Dias de gestação (dG); dias de infecção (dI).

4.4. Detecção sistêmica de citocinas nas fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ

Após a confirmação da infecção pelo parasitismo pulmonar e cerebral, nós avaliamos a produção de citocinas produzidas pelas fêmeas de ambas as linhagens de camundongos, para verificar se o perfil sistêmico de citocinas estaria relacionado com os danos gestacionais observados durante a infecção por *T. gondii*. Assim, os níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-17A foram mensurados nas amostras de soro das fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ por CBA.

Como resultado, a infecção por *T. gondii* provocou aumento aparentemente maior nos níveis de IL-2 no soro das fêmeas C57BL/KsJ do que nas CB10-H2, sendo estatisticamente significativa nas fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção ($p=0,0195$) (Figura 6A).

Entre as fêmeas da linhagem CB10-H2 houve aumento na detecção de IL-2 no soro das fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção, comparadas às fêmeas aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,05$) e, também, em relação às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p<0,01$) (Figura 6A).

Ambas as linhagens produziram níveis similares de IL-4, exceto nas fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção, cujos níveis dessa citocina foram significativamente maiores nas fêmeas da linhagem CB10-H2 do que nas C57BL/KsJ ($p=0,0195$) (Figura 6B).

Entre as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ houve um pico de produção de IL-4 aos 18 dias de gestação e infecção sendo que, nesta condição, a produção de IL-4 foi significativamente maior do que nas fêmeas não gestantes e não infectadas ($p<0,001$), aos 18 dias de gestação não infectadas ($p<0,01$) e não gestantes aos 18 dias de infecção ($p<0,01$). Além disso, a produção de IL-4 foi significativamente maior nas fêmeas

C57BL/KsJ aos 18 dias de gestação e infecção do que nas fêmeas C57BL/KsJ aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,05$) (Figura 6B).

Ao analisarmos a produção de IL-6, as fêmeas C57BL/KsJ produziram níveis significativamente maiores quando não gestantes e não infectadas ($p=0,0159$), aos 8 dias de gestação e infecção ($p=0,0159$), não gestantes aos 18 dias de infecção ($p=0,0079$) e aos 18 dias de gestação e infecção ($p=0,0159$) do que as fêmeas da linhagem CB10-H2 (Figura 6C).

Na linhagem CB10-H2, as fêmeas aos 8 dias de infecção, independente da gestação, produziram maiores níveis de IL-6 em relação às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p<0,001$) e, também, em relação às fêmeas aos 8 dias de gestação não infectadas ($p<0,001$) (Figura 6C). Além disso, as fêmeas CB10-H2 não gestantes produziram níveis de IL-6 significativamente menores aos 18 dias de infecção comparadas às fêmeas aos 8 dias de infecção ($p<0,001$) e essa produção também foi menor nas fêmeas aos 18 dias de gestação e infecção comparadas com as fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,001$) (Figura 6C).

Dentro da linhagem C57BL/KsJ, as fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,001$), bem como as fêmeas não gestantes aos 8 ($p<0,001$) e aos 18 ($p<0,01$) dias de infecção produziram maiores níveis de IL-6 em relação às fêmeas não gestantes e não infectadas (Figura 6C). As fêmeas C57BL/KsJ aos 8 dias de gestação e infecção também produziram maiores níveis de IL-6 em relação às fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção ($p<0,01$) e aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$). Por sua vez, a produção de IL-6 foi maior nas fêmeas não gestantes, com 8 dias de infecção em relação às fêmeas não infectadas, aos 8 dias de gestação ($p<0,001$) (Figura 6C).

As fêmeas C57BL/KsJ não gestantes aos 18 dias de infecção produziram maiores níveis de IL-6 do que as fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas

($p<0,01$) e, ainda, as fêmeas C57BL/KsJ produziram níveis significativamente maiores dessa citocina aos 18 dias de gestação e infecção do que as fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,001$) (Figura 6C).

A infecção por *T. gondii* induziu aumento nos níveis de IFN- γ aos 8 dias de infecção, independente da gestação, em ambas as linhagens, comparadas às fêmeas não gestantes e não infectadas, ($p<0,001$) e, também, às não infectadas, aos 8 dias de gestação ($p<0,001$) (Figura 6D).

Nas fêmeas C57BL/KsJ esse aumento foi significativo em relação as fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,0159$), bem como aos 18 dias de gestação e infecção ($p<0,0286$) (Figura 6D).

Além disso, as fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de infecção produziram maiores níveis de IFN- γ do que as fêmeas dessa linhagem aos 18 dias de infecção ($p<0,001$), independente da gestação, o que foi igualmente observado para as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ ($p<0,001$) (Figura 6D).

Quanto à detecção de TNF nas amostras de soro, as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ produziram maiores níveis dessa citocina em todas as condições experimentais analisadas ($p=0,0159$ para NG/Ni, NG/18dI, 8dG/Ni e 8dG/8dI; $p=0,0286$ para NG/8dI e 18dG/18dI; $p=0,0476$ para 18dG/Ni) em relação às fêmeas CB10-H2 (Figura 6E).

Embora as fêmeas C57BL/KsJ tenham apresentado maior produção de TNF do que as fêmeas CB10-H2, o perfil dessa citocina foi semelhante entre as diferentes condições experimentais para cada linhagem. Para ambas as linhagens, as fêmeas infectadas aos 8 e 18 dias, gestantes ou não, apresentaram alta produção de TNF tanto em relação às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p<0,01$ para CB10-H2 8dG/8dI e NG/18dI; $p<0,001$ para CB10-H2 NG/8dI e 18dG/18dI; $p<0,001$ para todas as

condições experimentais C57BL/KsJ) quanto em relação às aquelas não infectadas, gestantes aos 8 ou 18 dias ($p < 0,001$ para ambas as linhagens em todas as condições experimentais), respectivamente (Figura 6E).

Além disso, dentro da linhagem C57BL/KsJ, foi observado que os níveis de TNF no soro das fêmeas aos 8 dias de infecção, não gestantes foram maiores quando comparados às fêmeas aos 8 dias de infecção e gestação ($p < 0,001$). Contudo, aos 18 dias, as fêmeas não gestantes e infectadas apresentaram menor produção dessa citocina em relação às fêmeas gestantes e infectadas ($p < 0,05$). Ainda, aos 18 dias, os níveis de TNF das fêmeas C57BL/KsJ não gestantes e infectadas foram menores do que das fêmeas da mesma linhagem, aos 8 dias, sob as mesmas condições ($p < 0,001$) (Figura 6E).

Com relação à produção sistêmica de IL-17, as fêmeas C57BL/KsJ apresentaram maior detecção dessa citocina aos 18 dias de infecção, gestantes ($p = 0,0317$) ou não ($p = 0,0079$) do que as fêmeas da linhagem CB10-H2 nas mesmas condições (Figura 6F).

Aos 18 dias de gestação e infecção, as fêmeas C57BL/KsJ produziram maiores níveis de IL-17 comparadas tanto às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p < 0,01$) quanto às fêmeas não infectadas aos 18 dias de gestação ($p < 0,01$). Quando comparadas as fêmeas C57BL/KsJ infectadas aos 18 dias, as gestantes produziram maiores níveis de IL-17 em relação às fêmeas não gestantes ($p < 0,05$). Além disso, as fêmeas aos 18 dias de gestação e infecção apresentaram níveis maiores de IL-17 do que as fêmeas da mesma linhagem aos 8 dias de gestação e infecção ($p < 0,01$) (Figura 6F).

A infecção por *T. gondii* induziu aumento nos níveis de produção de IL-10 em ambas as linhagens, independentemente da gestação. Entretanto, as fêmeas CB10-H2 não gestantes aos 8 dias de infecção apresentaram maiores níveis de IL-10 no soro do

que as fêmeas C57BL/KsJ nas mesmas condições experimentais ($p=0,0426$) (Figura 6G).

Aos 8 dias de infecção, as fêmeas CB10-H2 gestantes e não gestantes produziram maiores níveis de IL-10 tanto em relação às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p<0,001$) quanto em relação às fêmeas aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$). Além disso, as fêmeas CB10-H2 não gestantes produziram maiores níveis de IL-10 aos 8 dias de infecção comparados aos 18 dias de infecção ($p<0,001$) (Figura 6G).

Aos 18 dias de gestação e infecção houve um pico de produção de IL-10 nas fêmeas C57BL/KsJ e essas tiveram produção significativamente maior dessa citocina do que as fêmeas não gestantes e não infectadas ($p<0,001$), aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$) e não gestantes aos 18 dias de infecção ($p<0,05$) (Figura 6G).

Esses dados sugerem que os danos gestacionais observados durante a infecção por *T. gondii* podem estar associados com os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos soros das fêmeas infectadas. Além disso, a infecção pelo parasito foi capaz de alterar a produção da citocina IL-10. Contudo, a alteração do perfil de citocinas foi mais evidente nas fêmeas da linhagem C57BL/KsJ.

Figura 6

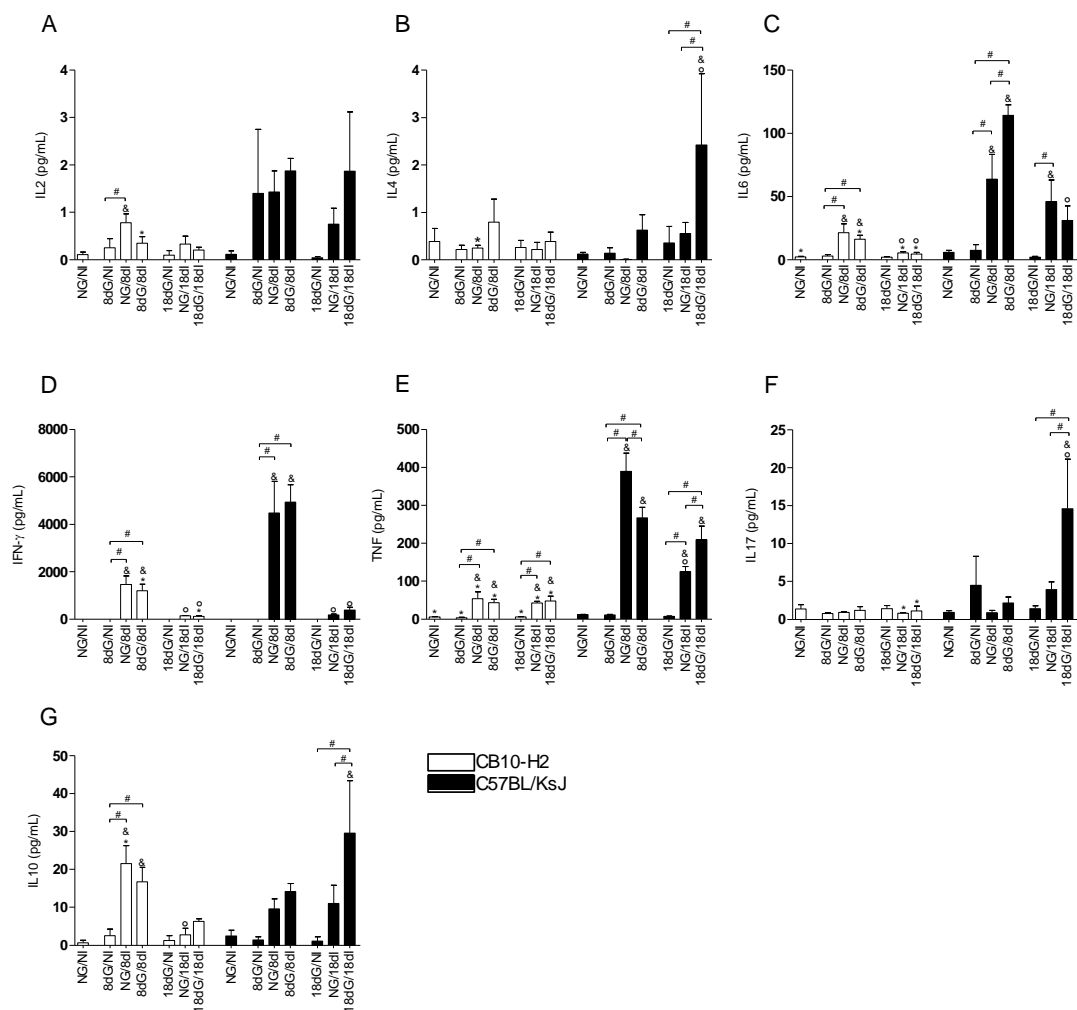


Figura 6. Mensuração de citocinas nas amostras de soro de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ não gestantes e não infectados; aos 8 e 18 dias de gestação, não infectados; aos 8 e 18 dias de infecção, não gestantes e aos 8 e 18 dias de gestação e infecção com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, por via oral, no primeiro dia de gestação. Os níveis de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IFN- γ (D), TNF (E), IL-17 (F) e IL-10 (G) foram detectados por Cytometric Beads Array (CBA). Não gestantes (NG); Não infectadas (NI); Dias de gestação (dG); Dias de infecção (dI). *Diferença significativa entre as linhagens de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ (Mann Whitney, $p < 0,05$). #Diferença significativa entre as várias condições experimentais de uma mesma linhagem de camundongo. °Diferença significativa entre as condições com 8 e 18 dias de gestação e/ou infecção de uma mesma linhagem de camundongo. &Diferença significativa das diferentes condições de uma mesma linhagem em relação aos seus respectivos controles NG/NI. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.5. Análise da expressão de mRNA de citocinas e do fator de transcrição FOXP3 no útero e placenta por qPCR

Além da avaliação de citocinas no soro das fêmeas experimentais, foram realizadas quantificações de mRNA para o fator de transcrição FOXP3, IL-13, IL-10, TGF- β , IL-17, IFN- γ e TNF para a determinação da expressão das mesmas *in situ* (homogenato de útero e placenta das fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ).

Com relação à expressão de mensagem para o fator de transcrição FOXP3, as fêmeas da linhagem CB10-H2 apresentaram níveis maiores de mRNA do que as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ tanto aos 8 quanto aos 18 dias de gestação e infecção ($p=0,0286$ para ambas as condições). De forma semelhante, as fêmeas CB10-H2 também apresentaram maior expressão comparadas às fêmeas C57BL/KsJ aos 18 dias de gestação, não infectadas e aos 18 dias de infecção, não gestantes ($p=0,0286$ para ambas as condições) (Figura 7A).

Quando analisada a expressão de FOXP3 no útero/placenta das fêmeas CB10-H2, foi observado que aos 8 e aos 18 dias de gestação e infecção, os níveis de mRNA foram maiores do que as fêmeas controles (NG/NI; $p<0,01$). Além disso, aos 18 dias de gestação e infecção a expressão de FOXP3 foi maior do que aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,01$) e não gestantes aos 18 dias de infecção ($p<0,001$) (Figura 7A).

Os dados referentes à expressão de FOXP3 nas fêmeas da linhagem C57BL/KsJ, demonstram que aos 8 dias de gestação, as fêmeas infectadas apresentaram maiores níveis de mRNA do que as fêmeas não infectadas ($p<0,05$). Quanto à expressão de FOXP3 aos 18 dias de infecção, essa foi maior nas fêmeas gestantes comparadas às não gestantes ($p<0,05$). Ainda, entre fêmeas C57BL/KsJ não gestantes, aquelas aos 18 dias de infecção apresentaram menor expressão desse fator de transcrição do que as fêmeas da mesma linhagem aos 8 dias de infecção ($p<0,05$) (Figura 7A).

No que se refere às citocinas IL-13 e IL-10, aos 8 dias de infecção a expressão de ambas foi significativamente maior nas fêmeas CB10-H2 em relação às C57BL/KsJ, independentemente da gestação ($p < 0,0286$) (Figuras 7B, C) e aos 18 dias de gestação a expressão de IL-13 foi significativamente maior nas fêmeas CB10-H2 em relação às fêmeas C57BL/KsJ, infectadas ($p = 0,0143$) ou não ($p = 0,0286$) (Figura 7B)

Aos 8 dias de gestação, as fêmeas CB10-H2 infectadas apresentaram maiores níveis de mensagem para IL-13 do que as fêmeas não infectadas ($p < 0,01$), o que foi igualmente observado para as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ ($p < 0,05$). Aos 18 dias de gestação as fêmeas CB10-H2 não infectadas ($p < 0,05$), bem como as fêmeas infectadas ($p < 0,001$) expressaram maiores níveis de mensagem para IL-13 em relação às fêmeas não gestantes aos 18 dias de infecção (Figura 7B). Além disso, as fêmeas CB10-H2 aos 8 e 18 dias de gestação e infecção apresentaram maior expressão de IL-13 em relação às fêmeas controles (NG/Ni; $p < 0,001$) (Figura 7B).

Entre as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ, apenas aquelas aos 8 dias de gestação e infecção apresentaram aumento significativo na expressão de mensagem para IL-13 em relação às fêmeas controles (NG/Ni; $p < 0,05$) (figura 7B). Além disso, as fêmeas não gestantes tiveram maiores níveis de expressão de mensagem para IL-13 aos 8 do que aos 18 dias de infecção em ambas as linhagens de camundongos ($p > 0,05$) (Figura 7B).

Quanto à expressão de IL-10, não houve variações estatisticamente significativas para essa citocina entre as fêmeas CB10-H2, embora as fêmeas controles (NG/Ni) tenham apresentado baixos níveis em relação as demais condições experimentais dessa linhagem (Figura 7C).

No que se refere à linhagem C57BL/KsJ, a expressão de IL-10 nas fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção ($p < 0,01$), bem como aos 18 dias de gestação e infecção ($p < 0,001$) tiveram maiores níveis de expressão quando comparadas às fêmeas controles

(NG/Ni; Figura 7C) enquanto que aos 18 dias de gestação, as fêmeas não infectadas tiveram menor expressão do que as fêmeas controles (NG/Ni; $p<0,05$).

Entretanto, as fêmeas C57BL/KsJ não gestantes aos 8 dias de infecção expressaram maiores níveis de mensagem para IL-10 do que as fêmeas aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$), bem como aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,01$). Aos 18 dias de gestação e infecção, houve maior expressão dessa citocina tanto em relação às fêmeas C57BL/KsJ não gestantes aos 18 dias de infecção ($p<0,001$) quanto aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$) (Figura 7C).

Além disso, as fêmeas C57BL/KsJ aos 18 dias de gestação e infecção tiveram maior expressão de IL-10 do que as fêmeas C57BL/KsJ aos 8 dias de gestação e infecção, enquanto que das fêmeas C57BL/KsJ não gestantes, aquelas aos 8 dias de infecção tiveram maior expressão dessa citocina do que as fêmeas aos 18 dias de infecção ($p<0,001$ para ambas as comparações) (Figura 7C).

Quanto à expressão de TGF- β , a infecção e gestação provocaram aumentos em aparentemente todas as condições analisadas nas fêmeas C57BL/KsJ em relação às CB10-H2. Esses aumentos foram significantes aos 8 e 18 dias de gestação e infecção, bem como nas fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas e nas não gestantes aos 18 dias de infecção ($p=0,0286$ para todas as condições) (Figura 7D).

Entre as diferentes condições das fêmeas C57BL/KsJ, não houve variações significativas quanto à expressão de TGF- β . No entanto, as fêmeas da linhagem CB10-H2 apresentaram baixa expressão de TGF- β aos 18 dias de gestação e infecção comparadas às fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,05$) e, também, não gestantes aos 18 dias de infecção ($p<0,05$) (Figura 7D).

Quando analisamos o mRNA para IL-17, a gestação ou infecção não alteraram a expressão dessa citocina nas fêmeas da linhagem C57BL/KsJ. Entretanto, as fêmeas da

linhagem CB10-H2 apresentaram maiores níveis de expressão de IL-17 aos 8 dias de gestação, infectadas ou não ($p=0,0286$), bem como aos 18 dias de gestação e infecção ($p=0,0143$) comparadas às fêmeas C57BL/KsJ nas mesmas condições (Figura 7E).

Além disso, as fêmeas CB10-H2 aos 18 dias de gestação e infecção tiveram aumento significativo na expressão de IL-17 em relação às fêmeas controles (NG/NI; $p<0,001$), não gestantes aos 18 dias de infecção ($p<0,001$) e aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$). Ainda, essas fêmeas tiveram maior expressão de IL-17 aos 18 dias de gestação e infecção comparada à expressão aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,01$) (figura 7E).

A infecção por *T. gondii* provocou aumento da mensagem para IFN- γ nas fêmeas da linhagem CB10-H2 e esse aumento foi significativamente maior nas fêmeas aos 18 dias de gestação, infectadas ($p=0,05$) ou não ($p=0,0286$) e também, nas fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção ($p=0,0383$) comparadas às fêmeas C57BL/KsJ nas mesmas condições (Figura 7F).

Além disso, houve aumento significativo na expressão de IFN- γ nas fêmeas CB10-H2 não gestantes aos 18 dias de infecção em relação às fêmeas CB10-H2 aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,05$), o que foi igualmente observado nas fêmeas C57BL/KsJ ($p<0,001$) (Figura 7F).

Nas fêmeas da linhagem C57BL/KsJ, houve um pico de expressão de IFN- γ nas fêmeas não gestantes aos 18 dias de infecção, que foi significativamente maior do que nas fêmeas controles (NG/NI; $p<0,05$), aos 18 dias de gestação e infecção ($p<0,001$) e, também, do que a expressão nas fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção ($p<0,01$) (Figura 7F).

A expressão de mRNA para TNF foi aparentemente maior nas fêmeas infectadas da linhagem C57BL/KsJ comparadas às fêmeas infectadas CB10-H2, sendo

significativamente maior nas fêmeas C57BL/KsJ aos 18 dias de gestação e infecção comparadas às fêmeas CB10-H2 na mesma condição ($p=0,0286$). Também aos 18 dias de gestação, as fêmeas C57BL/KsJ infectadas apresentaram níveis maiores de mRNA para TNF do que as fêmeas não infectadas da mesma linhagem ($p<0,05$). (Figura 7G).

Esses resultados sugerem que, embora haja expressão de mensagem para FOXP3 IL-10 e IL-13, sendo IL-10 e IL-13 citocinas importantes para a manutenção da gestação, essas não foram capazes de proteger as fêmeas CB10-H2 gestantes e infectadas contra os danos gestacionais provocados pelo parasito.

Além disso, apesar da maior expressão de mensagem para TGF- β , provavelmente não houve produção equivalente da citocina e, portanto, as fêmeas C57BL/KsJ não foram protegidas dos danos gestacionais provocados por *T. gondii*. Ainda, a alta expressão de mRNA para TNF e sua produção sistêmica, bem como de IFN- γ e IL-6 podem ter contribuído para os efeitos negativos durante a gestação.

Figura 7

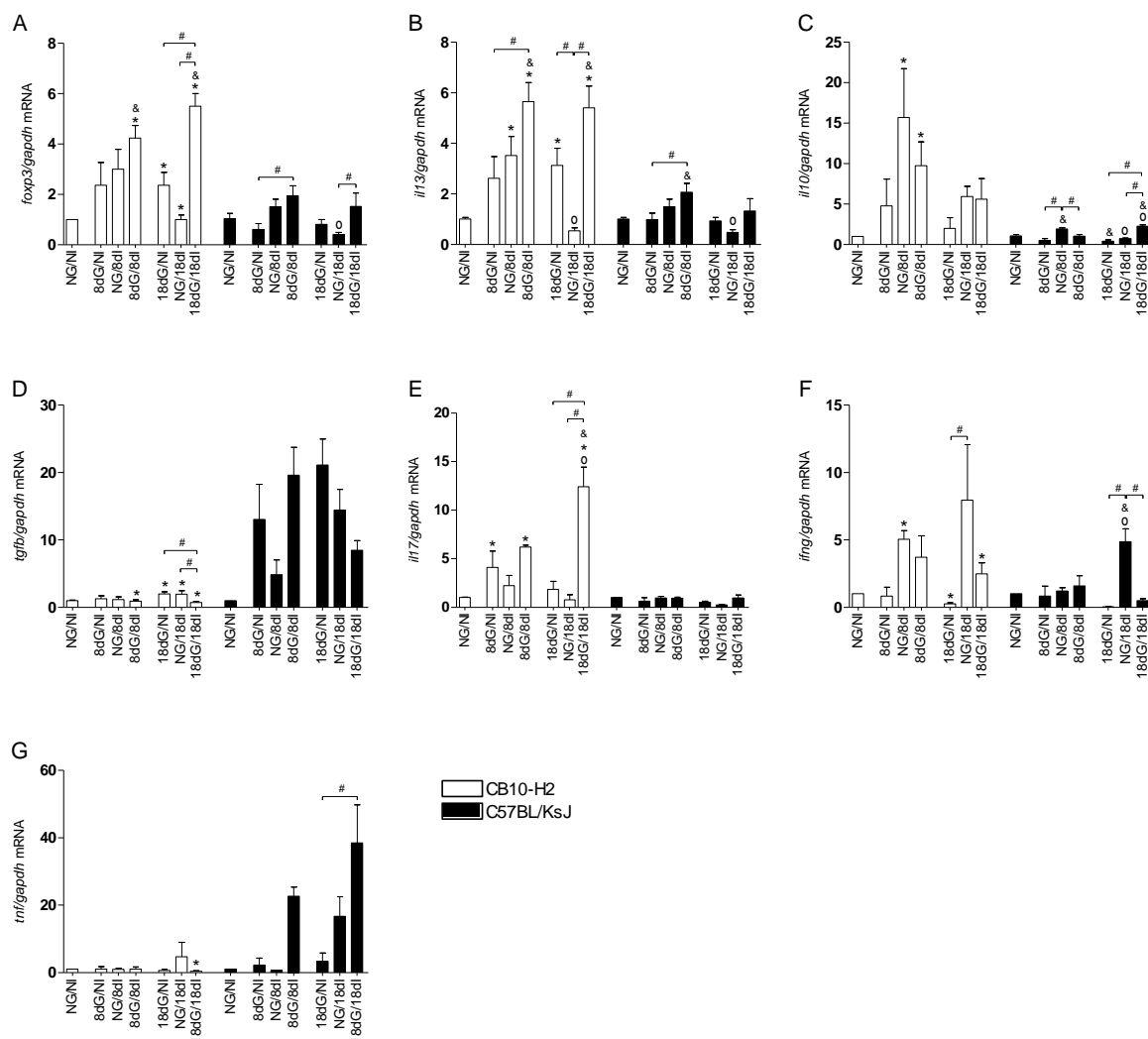


Figura 7: Quantificação das mensagens para FOXP3 (A), IL-13 (B), IL-10 (C), TGF- β (D), IL-17 (E), IFN- γ (F) e TNF (G) no homogenato de útero ou placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ não gestantes e não infectados; não gestantes aos 8 e 18 dias de infecção; aos 8 e 18 dias de gestação, não infectadas e aos 8 e 18 dias de gestação e infecção com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, por via oral. Os níveis de mRNA foram mensurados por reação de PCR quantitativa (qPCR). *Diferença significativa entre as linhagens de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ (Mann Whitney, $p < 0,05$). #Diferença significativa entre as várias condições experimentais de uma mesma linhagem de camundongo. °Diferença significativa entre as condições com 8 e 18 dias de gestação e/ou infecção de uma mesma linhagem de camundongo. &Diferença significativa das diferentes condições de uma mesma linhagem em relação aos seus respectivos controles NG/Nl. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Dias de infecção (dI), Dias de gestação (dG); Não infectadas (NI); Não gestantes (NG).

4.6. Detecção de mastócitos no útero/placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com *T.gondii*

Uma vez que os mastócitos têm participação no processo gestacional e funcionam como sentinelas nos tecidos, reconhecendo produtos microbianos, a infiltração dos mesmos no útero e placenta das fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ foi analisada e avaliada quanto ao estado de granulação (granulados/desgranulados) predominantemente encontrados em cada condição experimental.

Foi possível observar que com a progressão da gestação, nas fêmeas não infectadas, ocorreu diminuição na migração de mastócitos totais dos 8 para os 18 dias de gestação em ambas as linhagens (Figura 8A).

No entanto, a infecção induziu aumento na migração de mastócitos totais para o útero das fêmeas não gestantes de ambas as linhagens e esse aumento foi significativamente maior nas fêmeas C57BL/KsJ aos 8 ($p=0,0159$) e 18 ($p=0,0286$) dias de infecção quando comparadas às fêmeas da linhagem CB10-H2 nas mesmas condições (Figura 8A; Figura 9A, B, C, D). Além disso, as fêmeas CB10-H2 não gestantes, aos 18 dias de infecção tiveram maior migração de mastócitos para o útero do que as fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,01$) (Figura 8A).

Com relação à C57BL/KsJ, as fêmeas não gestantes aos 8 dias de infecção apresentaram maior migração de mastócitos do que as fêmeas aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,01$) e aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,05$) (Figura 8A). Aos 18 dias de infecção, as fêmeas C57BL/KsJ, gestantes ou não, tiveram maior migração de mastócitos do que as fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,05$ para 18dG/18dI; $p<0,001$ para NG/18dI). Contudo, dentre as fêmeas aos 18 dias de infecção,

as não gestantes apresentaram maior número de mastócitos totais comparadas àquelas aos 18 dias de gestação ($p < 0,001$) (Figura 8A).

De forma interessante, o número de mastócitos nas fêmeas C57BL/KsJ aos 18 dias de gestação, não infectadas é significativamente menor do que nas fêmeas controles (NG/NI; $p < 0,05$), enquanto que as fêmeas C57BL/KsJ não gestantes, aos 18 dias de infecção, o número de mastócitos é significativamente maior do que nas fêmeas controles (NG/NI; $p < 0,001$) (Figura 8A).

Com relação ao estado de granulação dos mastócitos, as fêmeas de ambas as linhagens aos 18 dias de gestação não infectadas e as fêmeas C57BL/KsJ aos 8 dias de infecção e gestação não apresentaram diferença entre o número de mastócitos granulados e desgranulados. Porém, nas demais condições analisadas, a quantidade de mastócitos desgranulados foi maior do que de mastócitos granulados: NG/NI ($p = 0,0286$ para ambas as linhagens), 8dG/NI ($p = 0,0295$ para CB10-H2 e $p = 0,0284$ para C57BL/KsJ), NG/8dI ($p = 0,0143$ para CB10-H2 e $p = 0,0286$ para C57BL/KsJ), 8dG/8dI ($p = 0,0278$ para CB10-H2), NG/18dI ($p = 0,0286$ para ambas as linhagens) e 18dG/18dI ($p = 0,0286$ para CB10-H2 e $p = 0,0143$ para C57BL/KsJ) (Figura 8B).

Ainda assim, analisando apenas os mastócitos granulados, foi possível observar diferenças entre as condições experimentais dentro da mesma linhagem. Aos 18 dias de infecção, as fêmeas CB10-H2 não gestantes tiveram maior infiltração de mastócitos granulados no útero do que as fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p < 0,001$) e aos 18 dias de gestação e infecção ($p < 0,001$). Além disso, o número de mastócitos granulados nessas fêmeas CB10-H2 aos 18 dias de infecção, não gestantes, foi significativamente maior do que nas fêmeas controles (NG/NI; $p < 0,001$) e em relação às fêmeas não gestantes, aos 8 dias de infecção ($p < 0,001$) (Figura 8B).

Com relação às fêmeas da linhagem C57BL/KsJ, tanto as fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,05$) quanto as fêmeas não gestantes, aos 18 dias de infecção ($p<0,001$) apresentaram aumento significativo de mastócitos granulados quando comparadas às fêmeas controles (NG/NI). Aos 8 dias de gestação e infecção, as fêmeas C57BL/KsJ apresentaram maiores quantidades de mastócitos granulados em relação às fêmeas não gestantes, aos 8 dias de infecção ($p<0,05$) e às fêmeas aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,01$) (Figura 8B).

Aos 18 dias de infecção, as fêmeas C57BL/KsJ não gestantes tiveram maior infiltração de mastócitos granulados no útero do que as fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas ($p<0,001$) e aos 18 dias de gestação e infecção ($p<0,001$). Além disso, quando não gestantes, as fêmeas C57BL/KsJ aos 18 dias de infecção apresentaram maiores quantidades de mastócitos granulados do que aos 8 dias de infecção ($p<0,001$). De forma contrária, aos 18 dias de gestação e infecção, as fêmeas C57BL/KsJ apresentaram menores quantidades de mastócitos granulados em relação às fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção ($p<0,01$) (Figura 8B).

Assim como nos mastócitos granulados, quando analisamos os mastócitos desgranulados foi possível observar diferentes perfis para as condições experimentais de cada linhagem. Nas fêmeas CB10-H2, observou-se que não houve diferença na quantidade de mastócitos desgranulados aos 8 dias de gestação e/ou infecção. Contudo, as fêmeas CB10-H2 não gestantes, aos 18 dias de infecção ($p<0,001$), bem como as fêmeas aos 18 dias de gestação e infecção ($p<0,05$) apresentaram aumento significativo no número de mastócitos desgranulados em relação às fêmeas CB10-H2 aos 18 dias de gestação, não infectadas (Figura 8B).

Em relação à linhagem C57BL/KsJ, as fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas apresentaram uma diminuição significativa no número de mastócitos

desgranulados quando comparadas às fêmeas controles (NG/NI; $p<0,001$). Contrariamente, nas fêmeas não gestantes, aos 18 dias de infecção houve um aumento na quantidade desses mastócitos em relação às fêmeas controles (NG/NI; $p<0,001$). Ainda, essas fêmeas C57BL/KsJ não gestantes, aos 18 dias de infecção apresentaram maiores quantidades de mastócitos desgranulados do que as fêmeas C57BL/KsJ não gestantes, aos 8 dias de infecção ($p<0,001$) (Figura 8B).

Aos 18 dias de infecção, tanto as fêmeas C57BL/KsJ gestantes ($p<0,01$) quanto não gestantes ($p<0,001$) apresentaram um aumento no número de mastócitos desgranulados quando comparadas às fêmeas aos 18 dias de gestação, não infectadas (Figura 8B). Ainda assim, fêmeas C57BL/KsJ não gestantes, aos 18 dias de infecção apresentaram maior número de mastócitos desgranulados nas em relação às fêmeas aos 18 dias de gestação e infecção ($p<0,001$) (Figura 8B).

Embora o perfil de mastócitos granulados e desgranulados tenha sido, de forma geral, semelhante em ambas as linhagens, foi observado que as fêmeas CB10-H2 aos 8 dias de gestação e infecção apresentaram menores quantidades de mastócitos granulados do que as fêmeas C57BL/KsJ na mesma condição ($p=0,0357$). Ainda, as fêmeas CB10-H2 não gestantes, aos 18 dias de infecção apresentaram menores quantidades de mastócitos desgranulados do que as fêmeas C57BL/KsJ na mesma condição ($p=0,0286$) (Figura 8B).

Para a verificação de mastócitos ativados, a expressão de mensagem para as quimases CMA1 e MCPT4 foram avaliadas por qPCR. Quanto a expressão de mRNA para CMA1, ambas as linhagens de camundongos produziram níveis similares na maioria das condições experimentais. Porém, as fêmeas C57BL/KsJ aos 18 dias de gestação, não infectadas apresentaram menor expressão do que as fêmeas CB10-H2 na mesma condição ($p=0,0286$). Contrariamente, ao analisarmos as fêmeas não gestantes,

aos 18 dias de infecção, foram observados maiores níveis de expressão nas fêmeas C57BL/KsJ quando comparadas às fêmeas CB10-H2 ($p=0,0286$) (Figura 8C).

Aos 18 dias, as fêmeas C57BL/KsJ infectadas, gestantes ou não, apresentaram maior expressão de quimase 1 do que as fêmeas gestantes não infectadas ($p<0,001$ para 18dG/18dI; $p<0,01$ para NG/18dI). Além disso, aos 18 dias de gestação as fêmeas C57BL/KsJ não infectadas apresentaram menores níveis dessa mensagem tanto em relação às fêmeas controles da mesma linhagem (NG/NI; $p<0,01$) quanto em comparação às fêmeas aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,01$) (Figura 8C). Para as fêmeas da linhagem CB10-H2, a infecção ou a gestação não foram capazes de modular a expressão de quimase 1 (Figura 8C).

Em relação à expressão de mRNA para MCPT4, as fêmeas da linhagem CB10-H2, aparentemente, apresentaram maiores níveis de mRNA em comparação com as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ, embora esse aumento tenha sido estatisticamente significativo apenas nas fêmeas aos 18 dias de infecção, gestantes ($p=0,0143$) ou não ($p=0,0286$) (Figura 8D).

As fêmeas CB10-H2 expressaram maiores níveis de mRNA para MCPT4 aos 8 dias de gestação e infecção em relação as fêmeas controles (NG/NI; $p<0,05$). Contrariamente, as fêmeas C57BL/KsJ expressaram menores níveis aos 8 dias de gestação, não infectadas ($p<0,01$) bem como não gestantes aos 8 dias de infecção ($p<0,05$) e, também, aos 18 dias de gestação, infectadas ($p<0,05$) ou não ($p<0,01$) quando comparadas às fêmeas controles (NG/NI; Figura 8D).

Juntos, esses resultados demonstram que ao longo da gestação ocorre diminuição progressiva na quantidade de mastócitos no útero/placenta e que a infecção por *T. gondii* provoca aumento na migração desse tipo celular para esses órgãos,

principalmente aos 18 dias. No entanto, quando a infecção acontece durante a gestação, ocorre modulação no processo de migração de mastócitos em ambas as linhagens.

Figura 8

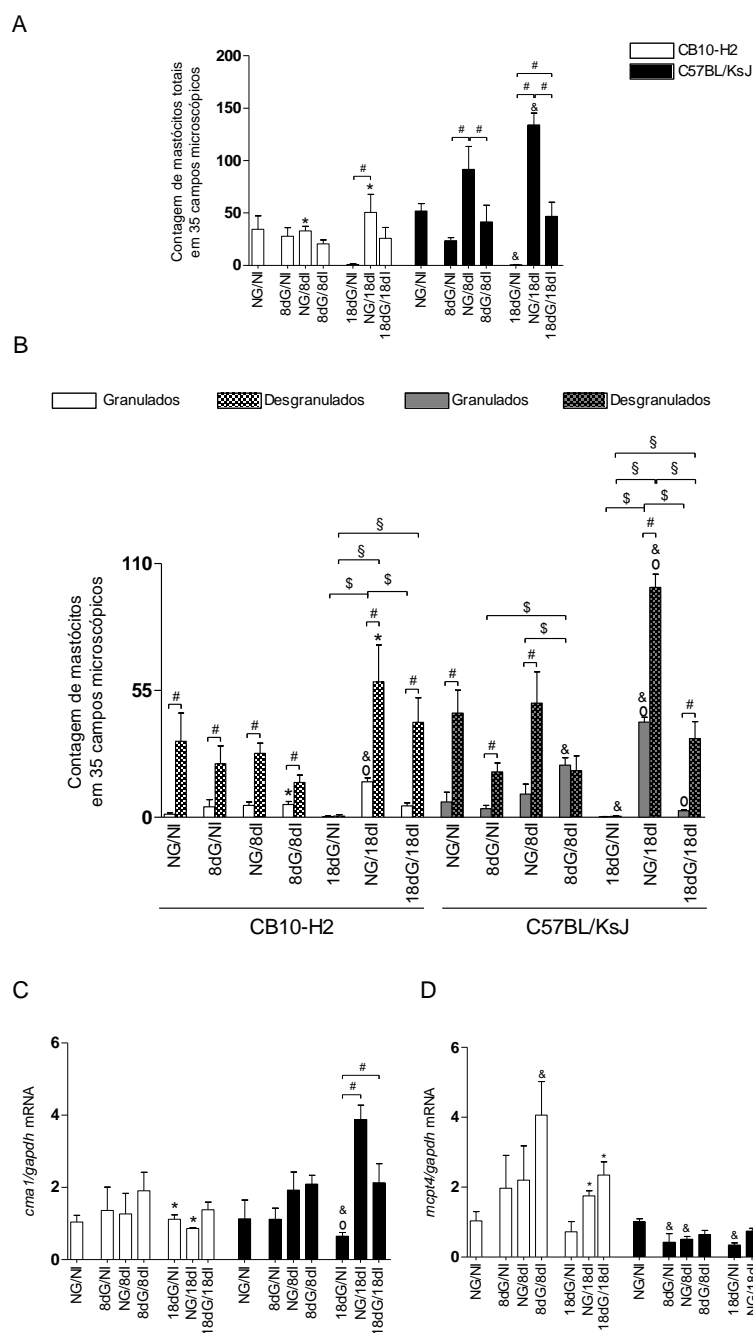


Figura 8: Contagem de mastócitos totais (A), granulados e desgranulados (B) no útero/placenta e quantificação das mensagens para quimase 1 (CMA1) (C) e protease 4 de mastócitos (MCPT4) (D) no homogenato de útero ou placenta de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ não gestantes e não infectadas (NG/Ni); aos 8 e 18 dias de gestação, não infectadas (8dG/Ni; 18dG/Ni); não gestantes aos 8 e 18 dias de infecção (NG/8dI; NG/18dI) e aos 8 e 18 dias de gestação e infecção (8dG/8dI; 18dG/18dI) com 5 cistos de *T. gondii* por via oral. *Significância estatística entre as linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ (Teste *t* de Student, $p < 0,05$). #Significância estatística entre mastócitos granulados versus desgranulados dentro de cada linhagem. °Diferença significativa entre as condições com 8 e 18 dias de gestação e/ou infecção de uma mesma linhagem de camundongo. &Diferença significativa das diferentes condições de uma mesma linhagem em relação aos seus respectivos controles NG/Ni. §Diferença estatística entre mastócitos granulados dentro da mesma linhagem. §Diferença estatística entre mastócitos desgranulados dentro da mesma linhagem. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Dias de infecção (dI), Dias de gestação (dG); Não infectadas (NI); Não gestantes (NG).

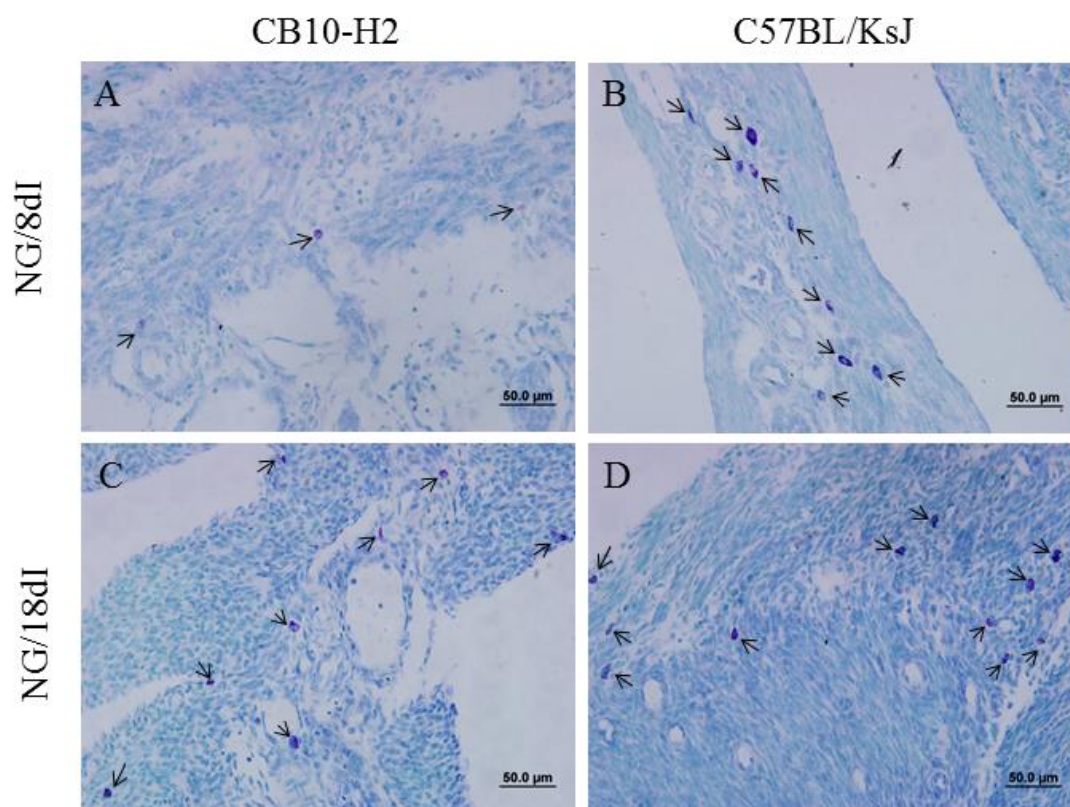
Figura 9

Figura 9: Fotomicrografia representativa do útero de fêmeas não gestantes CB10-H2 (A) e C57BL/KsJ (B) aos 8 dias de infecção, com menores quantidade de mastócitos, e útero de fêmeas não gestantes CB10-H2 (C) e C57BL/KsJ (D) aos 18 dias de infecção, com maiores quantidades de mastócitos. As setas apontam os mastócitos desgranulados.

4.7. Detecção sorológica de anticorpos IgG e os isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b específicos contra *T. gondii* em fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas com o parasito

Para verificar a produção de anticorpos específicos contra *T. gondii* durante a infecção, os níveis de IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b foram analisados em amostras de soro das fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ. Os níveis de imunoglobulinas foram mensurados por ELISA e apresentados somente aos 18 dias de infecção, uma vez que aos 8 dias de infecção não foi observada detecção de IgG anti-*T. gondii* (dados não mostrados).

Comparativamente, as fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ apresentaram níveis similares de anticorpos IgG totais, independentemente da gestação. Além disso, as fêmeas CB10-H2 gestantes ou não apresentaram produção semelhante de IgG total, entretanto, as fêmeas C57BL/KsJ não gestantes produziram maiores níveis de IgG total comparadas com as fêmeas C57BL/KsJ gestantes ($p=0,0380$) (Figura 10A).

Independente da gestação, as fêmeas CB10-H2 produziram maiores níveis de IgG1 ($p=0,0159$ para as fêmeas não gestantes e $p=0,0282$ para as gestantes) (Figura 10B) e, também, maiores níveis de IgG2a ($p=0,0159$ para as fêmeas não gestantes e $p=0,0357$ para as gestantes) comparadas às fêmeas C57BL/KsJ nas mesmas condições (Figura 10C).

Os níveis de IgG2a (Figura 10C) foram aparentemente maiores do que os níveis de IgG1 (Figura 10B) nas fêmeas CB10-H2, independente da gestação, enquanto que as fêmeas da linhagem C57BL/KsJ produziram níveis aparentemente similares de IgG1 e IgG2a, independente da gestação (Figuras 10B, C).

De maneira interessante, as fêmeas C57BL/KsJ não gestantes produziram maiores níveis de IgG2b anti-*T. gondii* do que as fêmeas CB10-H2 ($p=0,0159$). Além

disso, as fêmeas C57BL/KsJ gestantes também produziram níveis de IgG2b aparentemente maiores do que as fêmeas CB10-H2 na mesma condição (Figura 10D).

Para verificar se houve alteração no perfil de resposta dos isotipos IgG2a e IgG1, bem como IgG2b e IgG1, foram calculadas as razões IgG2a/IgG1 e IgG2b/IgG1 para todas as condições experimentais analisadas.

De acordo com os maiores níveis de IgG2a e IgG1 específicos observados nas fêmeas CB10-H2, a razão IgG2a/IgG1 aos 18 dias de infecção foi maior nas fêmeas CB10-H2 não gestantes do que nas fêmeas C57BL/KsJ ($p=0,0317$) bem como nas fêmeas CB10-H2 gestantes comparadas às C57BL/KsJ ($p=0,0286$) na mesma condição (Figura 10E). Nas fêmeas C57BL/KsJ, foi observado maior aumento da razão IgG2b/IgG1 aos 18 dias de infecção nas fêmeas não gestantes do que nas CB10-H2 ($p=0,0079$) bem como nas fêmeas gestantes comparadas às CB10-H2 ($p=0,0286$) na mesma condição (Figura 10F).

Deste modo, os dados apresentados indicam que produção de anticorpos não foi suficiente para proteger as fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ da infecção por *T. gondii*, uma vez que uma alta carga parasitária foi observada no cérebro das fêmeas aos 18 dias de infecção, gestantes ou não, bem como alta perda embrionária.

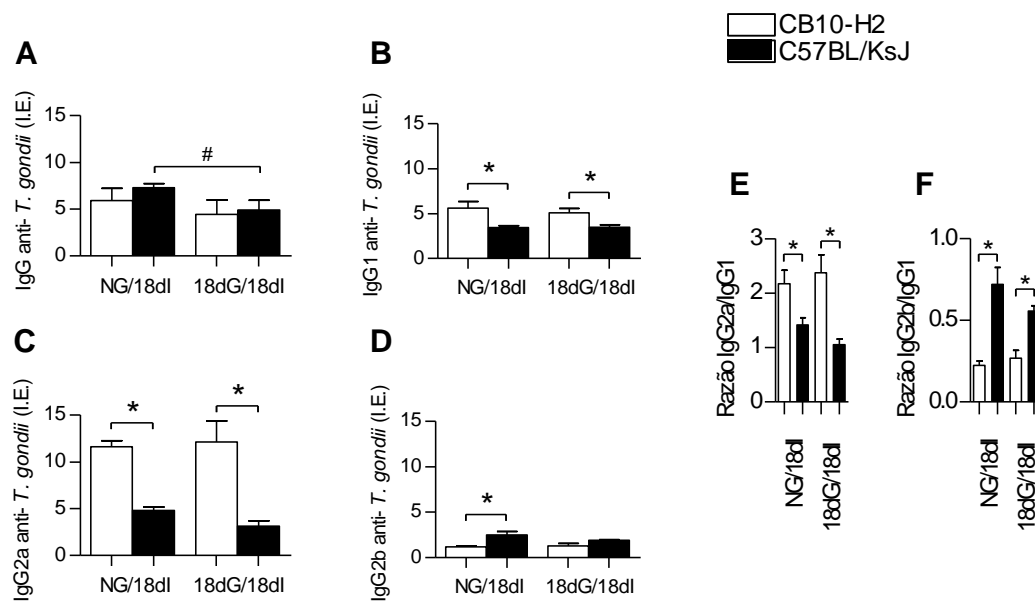
Figura 10

Figura 10: Níveis de IgG total (A), IgG1 (B), IgG2a (C) e IgG2b (D) anti-*T. gondii* em amostras de soro de fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ não gestantes, aos 18 dias de infecção e aos 18 dias de gestação e infecção. A razão entre IgG2a/IgG1 (E) e IgG2b/IgG1 também foi analisada. As fêmeas foram infectadas com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral, o soro foi coletado nos tempos indicados por punção do plexo retro-orbital e os níveis de anticorpos foram mensurados pelo teste ELISA e representados pelo Índice ELISA (I.E.). Não gestantes (NG); Não infectadas (NI); Dias de gestação (dG); Dias de infecção (dI).

5. Discussão

O objetivo do presente estudo foi analisar, comparativamente, o resultado da gestação e resposta imune em camundongos da linhagem CB10-H2, o qual apresenta o background genético do BALB/c, e o haplotipo do MHC do C57BL/6, e C57BL/KsJ, o qual apresenta o background genético do C57BL/6, e o haplotipo do MHC do BALB/c submetidos à infecção por *T. gondii* no primeiro dia de gestação.

Foi observado que aos 8 dias de gestação e infecção, a taxa de reabsorção fetal/aborto foi de 60% na linhagem CB10-H2 e 67% na linhagem C57BL/KsJ, enquanto que aos 18 dias de gestação e infecção, essa taxa foi de 80% na linhagem CB10-H2 e de 100% na linhagem C57BL/KsJ.

Estudos prévios demonstraram que a toxoplasmose congênita está associada com resultados gestacionais adversos em camundongos e que aos 8 dias de gestação e infecção, todas as fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 apresentaram sítios de implantação no útero (taxa de reabsorção fetal/aborto igual a zero), enquanto que aos 19 dias de gestação e infecção a taxa de reabsorção fetal/aborto foi de 50% na linhagem BALB/c comparada a uma taxa de 90% na linhagem C57BL/6 (COUTINHO et al., 2012).

Essa taxa de 60 (CB10-H2) e 67% (C57BL/KsJ) de reabsorção embrionária observado aos 8 dias de gestação e infecção, comparada à taxa observada nos nossos estudos anteriores em camundongos BALB/c e C57BL/6 na mesma condição (COUTINHO et al., 2012) e, ainda, as taxas de 30 (CB10-H2) e 10% (C57BL/KsJ) de reabsorção fetal/aborto observado aos 18 dias de gestação e infecção comparadas às taxas observadas nas linhagens BALB/c e C57BL/6 (COUTINHO et al., 2012) pode ser devido à influência do haplotipo do MHC e sugere que o background genético dos camundongos BALB/c, em associação com o haplotipo do MHC H-2^d, são necessários

para promover algum nível de proteção contra as taxas de aborto e reabsorção fetal nos casos de toxoplasmose congênita.

Estudos prévios demonstraram que fêmeas C57BL/6 gestantes submetidas à infecção com 400 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* aos 8 dias de gestação apresentaram fetos e placentas hemorrágicos e com tamanho reduzido no sexto dia após a infecção (14 dias de gestação) e a hemorragia era evidente nas placentas dos grupos infectados, além disso, a taxa de aborto do grupo infectado foi significativamente maior do que a observada nas fêmeas não-infectadas (LIU et al., 2014). Do mesmo modo, fêmeas C57BL/6 submetidas à infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii* no primeiro dia de gestação apresentaram sítios de implantação necróticos com focos inflamatórios no útero aos 8 dias de gestação e infecção e tal linhagem apresentou lesões mais graves no útero e placenta do que as fêmeas da linhagem BALB/c (COUTINHO et al., 2012).

No presente estudo foi observado que nas fêmeas CB10-H2 todos os sítios de implantação apresentavam-se hemorrágicos e necróticos aos 8 dias de gestação e infecção, o que foi igualmente observado nas fêmeas C57BL/6 também aos 8 dias de gestação e infecção (COUTINHO et al., 2012). Com relação às fêmeas C57BL/KsJ, também aos 8 dias de gestação e infecção, a maioria dos animais gestantes e infectados não apresentaram sítios de implantação, sendo que duas fêmeas apresentaram sítios de implantação e, em uma delas todos eles estavam hemorrágicos, enquanto que na outra fêmea todos os sítios apresentaram-se normais. Os dados sugerem que as alterações histológicas mais graves observadas em ambas as linhagens não são influenciadas unicamente pelo haplotipo H-2^b do MHC.

Nossos estudos prévios realizados com fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 demonstraram que *T. gondii* é raramente encontrado no útero e placenta das fêmeas aos 8 e 19 dias de gestação e infecção (COUTINHO et al., 2012). Do mesmo

modo, fêmeas do roedor *Calomys callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii* apresentam baixa concentração de parasitos na placenta (FRANCO et al., 2015). As fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ também apresentaram baixo número de parasitos detectados por imunohistoquímica no útero e placenta quando infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii* no dia da detecção da rolha vaginal.

Como a expressão do mRNA de SAG1 tem sido utilizado para detecção de taquizoitos em órgãos de animais (SINGH et al.; 2010), nesse estudo foi verificado a expressão de SAG1 no útero/placenta dos animais infectados e níveis mínimos de expressão de foram detectados nesses órgãos. Ao contrário, quando fêmeas de camundongos Kunming são infectadas, via vaginal, com a cepa RH de *T. gondii* entre os dias 10 e 16 de detecção de rolha vaginal, a expressão de mensagem para SAG-1 foi detectada no útero e placenta das fêmeas gestantes (FU et al., 2015). No entanto, em um estudo no qual 785 placentas foram analisadas, incluindo 51 placentas de casos de toxoplasmose congênita documentados, *T. gondii* foi detectado em apenas 16 placentas, incluindo uma na qual a toxoplasmose congênita havia sido descartada (FILISSETTI et al., 2010). Isso sugere que a via de infecção, a cepa do parasito e o período gestacional no qual ocorre a infecção influenciam na detecção do parasitismo tecidual no útero e placenta e, ainda, que o aborto ocorre independente da presença do parasito nesses órgãos.

O pulmão e o cérebro foram analisados para detecção de parasitos e os mesmos foram encontrados no pulmão de todas as fêmeas avaliadas, tanto CB10-H2 quanto C57BL/KsJ, enquanto que, no cérebro, *T. gondii* foi encontrado principalmente aos 18 dias de infecção em ambas as linhagens de camundongos, independente da gestação. Resultados similares foram observados nas fêmeas de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 (COUTINHO et al., 2012) e estão de acordo com os dados

observados por Resende e colaboradores (2008) nos quais *T. gondii* foi encontrado no cérebro de camundongos das linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ infectados com a cepa ME-49 do parasito.

Deste modo, a gestação não interferiu na disseminação do parasito para o pulmão e cérebro dos camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectados e, embora não tenham sido encontrados parasitos no útero e placenta dos camundongos experimentais, acredita-se que os danos gestacionais estejam relacionados com a resposta imune desenvolvida no útero após a infecção do hospedeiro pelo parasito.

O balanço de citocinas vem sendo descrito como um mecanismo muito importante na determinação da sobrevivência do feto no útero materno sendo que as células Th2 são predominantes na decídua de mulheres durante os estágios precoces da gestação (SAITO, 2000). No entanto, a infecção por *T. gondii* provoca alterações no balanço Th1/Th2 na placenta como foi evidenciado pela diminuição nos níveis de IL-4 e IL-10 e aumento de IFN- γ *in vivo* (MAO et al., 2007) e *in vitro* (ZHANG et al., 2006). Na gestação dos mamíferos foi demonstrado que a produção de citocinas de perfil Th2 e Th3, como IL-4, IL-10 e TGF- β , favorecem a manutenção da gestação durante o primeiro trimestre (LIN et al., 1993) enquanto que o predomínio do padrão Th1 (alta regulação de IL-2, IFN- γ e TNF- α) provoca a rejeição do feto na interface materno-fetal (RAGHUPATHY, 2001).

Além disso, durante a gestação normal os tecidos placentários humanos induzem a expansão de células Tregs CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺ juntamente com o aumento na produção de IL-10, enquanto que as produções de IFN- γ (Th1), IL-13 (Th2) e IL-17 (Th17) não são induzidas (SVENSSON-ARVELUND et al., 2015).

No nosso estudo as fêmeas CB10-H2 apresentaram altos níveis de IL-6 aos 8 dias de gestação e infecção enquanto que esses níveis foram altos aos 8 e 18 dias de

gestação e infecção para as fêmeas C57BL/KsJ, bem como altos níveis de IFN- γ aos 8 dias de infecção para ambas as linhagens, independente da gestação e, ainda, altos níveis de TNF aos 8 e 18 dias de gestação e infecção nas amostras de soro, o que pode ser associado aos danos gestacionais observados nos casos de toxoplasmose congênita.

Estudos anteriores do nosso grupo (COUTINHO et al., 2012) verificaram que aos 8 dias de gestação e infecção as fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 também apresentaram altos níveis de IFN- γ e TNF nas amostras de soro e, além disso, as fêmeas C57BL/6 apresentaram maiores níveis de TNF em relação às fêmeas BALB/c, o que persistiu aos 19 dias de gestação e infecção. No presente trabalho observou-se que as fêmeas C57BL/KsJ também apresentaram maiores níveis de IFN- γ , IL-6 e TNF no soro aos 8 dias de infecção quando comparadas às fêmeas CB10-H2 sugerindo que a produção de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas na infecção por *T. gondii* esteja relacionada com o background genético dos camundongos C57BL/6.

Interessante que no homogenato de útero das fêmeas CB10-H2 aos 8 e 18 dias de infecção foram observados altos níveis de expressão de mensagem para FOXP3 e IL-13 comparados com os níveis observados nas fêmeas C57BL/KsJ. A gestação aparentemente aumentou a expressão nos órgãos das fêmeas CB10-H2 e a infecção induziu aumento adicional nesses níveis de expressão, sendo que um perfil similar foi observado para os níveis de expressão de mensagem para IL-10. A infecção por *T. gondii* por si só não provoca aumento relevante na expressão de mensagem para FOXP3 em relação às fêmeas somente gestantes, contudo, a gestação e infecção concomitantes provoca aumento relevante nessa expressão, o que pode ser um mecanismo de controle da infecção e manutenção da gestação.

Portanto, no útero/placenta das fêmeas CB10-H2 a expressão de mensagens para FOXP3, IL-13 e IL-10 parece estar relacionada com o background genético dos camundongos BALB/c.

Previamente foi demonstrado que a citocina IL-10 oferece proteção contra a toxoplasmose congênita. Quando camundongos gestantes foram infectados por *T. gondii* aos 8 dias de gestação e tratados com IL-10 recombinante no décimo e décimo segundo dias de gestação, houve diminuição na taxa de reabsorção fetal em relação às fêmeas gestantes, infectadas e não tratadas e a detecção de IFN- γ diminuiu no sobrenadante placentário das fêmeas tratadas (ZHANG et al., 2012a). Além disso, a IL-10 é capaz de reduzir a apoptose de células Tregs decíduais contribuindo para a melhora dos resultados gestacionais adversos provocados pela infecção por *T. gondii*, sendo que camundongos gestantes IL-10^{-/-} apresentam uma regulação positiva das caspases 3 e 8 associadas com os resultados gestacionais prejudicados (LAO et al., 2015). Outros trabalhos demonstraram diminuição no número de Tregs CTLA-4⁺ e PD-1⁺ no baço e na interface materno-fetal de camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* aos 8 dias de gestação e sacrificados 6 dias após a infecção sugerindo, mais uma vez, que a infecção por *T. gondii* induz apoptose de células Tregs (LIU et al., 2014).

Além disso, fêmeas de camundongos C57BL/6 gestantes e infectadas aos 8 dias de gestação também apresentaram níveis diminuídos de células Tregs (GE et al., 2008; ZHANG et al., 2012b) e níveis elevados de células Th17 na placenta das fêmeas gestantes e infectadas (ZHANG et al., 2012b). No presente trabalho, a expressão de mensagens para FOXP3 ou IL-10 ou IL-13 no útero/placenta das fêmeas CB10-H2, não foi capaz de regular os níveis das citocinas pró-inflamatórias encontrados nos camundongos infectados, gestantes ou não, o que pode ter resultado nos danos gestacionais observados nessa linhagem.

De modo surpreendente, a expressão de mensagem para TGF- β foi baixa nas fêmeas CB10-H2 aos 8 e 18 dias de infecção, gestantes ou não, comparada às fêmeas C57BL/KsJ e essa linhagem apresentou maiores níveis de expressão de mensagem para TGF- β nas fêmeas infectadas comparadas com as fêmeas não infectadas. Ao contrário do que foi observado no nosso estudo, fêmeas C57BL/6 gestantes e infectadas aos 8 dias de gestação apresentaram baixos níveis de TGF- β na placenta 6 dias após a infecção (ZHANG et al., 2012a), além disso, *T. gondii* induziu redução nos níveis de IL-10 e TGF- β e aumento nos níveis de IFN- γ na interface materno-fetal (LIU et al., 2014).

Os diferentes resultados relacionados à detecção de TGF- β observados no nosso trabalho podem estar associados aos períodos gestacionais e de infecção e, também com as diferentes cepas do parasito utilizadas nos diferentes trabalhos. Além disso, nós mensuramos a expressão de mensagem enquanto nos outros trabalhos (LIU et al., 2014; ZHANG et al., 2012a) houve mensuração de TGF- β em homogenatos de placenta. Entretanto, apesar da alta expressão de mensagem para TGF- β observada no nosso trabalho, não houve prevenção dos danos gestacionais observados nas fêmeas C57BL/KsJ, o que pode sugerir que nem toda a mensagem para TGF- β tenha sido traduzido em proteína, o que necessita ser investigado em trabalhos posteriores. Além disso, essa linhagem de camundongo apresentou níveis de expressão de mensagem para TNF aparentemente maiores no útero/placenta aos 8 dias de gestação e infecção, e significativamente maiores aos 18 dias de gestação e infecção, assim como maiores níveis sistêmicos dessa citocina quando comparado aos animais CB10-H2.

Resultados anteriores demonstraram que fêmeas C57BL/6 gestantes e infectadas no dia da detecção da rolha vaginal apresentaram maiores números de células apoptóticas quando comparadas com as fêmeas BALB/c (COUTINHO et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado que a citocina IFN- γ secretada por células NK decíduais induz apoptose de células trofoblásticas humanas *in vitro* (ZHANG et al., 2015). As citocinas TNF e IFN- γ podem aumentar a apoptose dos trofoblastos a partir da modulação da expressão de Fas/FasL (ASCHKENAZI et al., 2002). Na presente investigação, experimentos adicionais são necessários para investigar se os danos gestacionais provocados pela infecção por *T. gondii* possam estar relacionados com aumento de apoptose das células trofoblásticas induzida pela alta produção de TNF e IFN- γ nos camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ.

Além da resposta imunológica humoral, muitos mediadores podem ser produzidos pelos mastócitos, dentre eles TNF (GALLI et al., 2005) e uma vez ativados, essa citocina estocada nesse tipo celular pode ser rapidamente liberada, juntamente com, IL-33 e IL-1 (GU et al., 2015), além de diversas proteases específicas de mastócitos, como quimases, triptases e carboxipeptidases (PEJLER et al., 2010; TRIVEDI; CAUGHEY, 2010; CAUGHEY, 2011; LUNDEQUIST; PEILER, 2011).

As proteases de mastócitos contribuem para a resistência de infecções parasitárias. Knight e colaboradores (2000) demonstraram a expulsão tardia de helmintos adultos e aumento na deposição muscular de larvas em camundongos deficientes em MCP-1. Além disso, Shin e colaboradores (2008) mostraram que a MCP-6 é importante para a eliminação da infecção crônica por *Trichinella spiralis* a partir do recrutamento de eosinófilos para a larva de *T. spiralis*, e a eliminação das larvas no músculo esquelético cronicamente infectado foi prejudicada nos camundongos deficientes em MCP-6/Tpsb2.

Devido ao fato de que a infiltração de eosinófilos ao redor da larva de *T. spiralis* também ter sido prejudicada nos camundongos deficientes em IgE, acredita-se que os

mastócitos e, mais especificamente, a imunidade inata e adaptativa estejam relacionados com a MCP-6/Tpsb2 na fase crônica da infecção por *T. spiralis* (SHIN et al., 2008).

Com a progressão da gestação observou-se diminuição na migração de mastócitos, enquanto que a infecção por *T. gondii* mantém o número dessas células em ambas as linhagens, ou aumenta como observado em camundongos C57BL/KsJ aos 18 dias de infecção, possivelmente participando da eliminação do parasito e ao mesmo tempo envolvimento do processo gestacional.

No nosso trabalho nós observamos que nas fêmeas C57BL/KsJ, embora a quantidade de mastócitos granulados e desgranulados seja similar aos 8 dias de gestação e infecção, houve um pico tanto na expressão de mensagem, quanto na produção de TNF nas fêmeas C57BL/KsJ aos 8 dias de gestação e infecção. Esses dados sugerem que os mastócitos podem estar envolvidos na maior produção de TNF, como foi detectado sistemicamente, e maior expressão no útero/placenta nessa linhagem de camundongos. Além disso, houve um aparente aumento na expressão de mensagem para CMA1 nas fêmeas C57BL/KsJ aos 8 e 18 dias de infecção, entretanto, foi observada uma diminuição na expressão de MCPT4. A quimase CMA1 (α -quimase) é mais expressa na diferenciação precoce dos mastócitos, enquanto que a MCPT4 (β -quimase) aparece numa fase mais tardia da diferenciação (GURISH et al., 1992), porém não sabemos ainda se esses fatores estariam influenciando o resultado da gestação em nossos estudos.

Já aos 18 dias de infecção, as fêmeas de ambas as linhagens apresentaram quantidades significativamente maiores de mastócitos desgranulados em relação aos granulados, independentemente da gestação. Em paralelo, a expressão de mRNA para TNF, bem como sua produção sistêmica nas fêmeas C57BL/KsJ foi alta e significativamente maior aos 18 dias de gestação e infecção comparada a produção de

TNF nas fêmeas CB10-H2 na mesma condição. Porém, a expressão de CMA1 foi aumentada nas fêmeas C57BL/KsJ e, ao contrário, a expressão de MCPT4 foi diminuída nessas fêmeas aos 8 e 18 dias de infecção, independentemente da gestação. De modo contrário, as fêmeas CB10-H2 apresentaram um aumento aparente na expressão de MCPT4 aos 8 e 18 dias de gestação e infecção. Sabe-se que a protease 4 de mastócitos murina (mMCP-4) está relacionada com auto-imunidade e doenças inflamatórias, porém, o mecanismo exato em relação a sua função nessas condições patológicas permanece obscuro (LIN et al., 2011). Em relação aos nossos resultados, a expressão diferenciada de quimases nos mastócitos das linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ pode estar relacionada a diferentes funções e estados de ativação dessas células nesses sítios, e estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel dessas células no útero/placenta.

As análises dos isotipos de IgG específicos anti-*T. gondii* em estudos prévios demonstraram que os níveis de anticorpos IgG são aparentemente maiores no soro das fêmeas BALB/c gestantes e infectadas comparadas com as fêmeas C57BL/6 aos 19 dias de gestação e infecção (COUTINHO et al., 2012).

No presente estudo nós observamos que aos 18 dias de infecção, independentemente da gestação, tanto as fêmeas CB10-H2 quanto as C57BL/KsJ apresentaram níveis similares de IgG total específicos contra *T. gondii* no soro.

O isotipo de imunoglobulina IgG2a em camundongos é reconhecido como característico de resposta tipo Th1 e IgG1 como Th2 (SNAPPER; PAUL, 1987). Foi demonstrado anteriormente, que os níveis de IgG2a foram maiores do que os níveis de IgG1 tanto no soro das fêmeas BALB/c quanto nas C57BL/6, gestantes e não-gestantes, porém, aos 19 dias de gestação e infecção as fêmeas BALB/c gestantes apresentaram maiores níveis de IgG1 e IgG2a nas amostras de soro comparadas às fêmeas C57BL/6

(COUTINHO et al., 2012). Nossos resultados mostraram que os níveis de IgG2a foram maiores do que os níveis de IgG1 em fêmeas das linhagens CB10-H2, e C57BL/KsJ quando não gestantes, sendo que as fêmeas CB10-H2 apresentaram maiores níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a do que as fêmeas C57BL/KsJ.

Esses resultados, juntamente com nossos dados anteriores (COUTINHO et al.; 2012) sugerem que os níveis mais elevados de produção das imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgG2a parecem estar relacionadas ao background genético de camundongos BALB/c. Além disso, as fêmeas C57BL/KsJ apresentaram maiores níveis de IgG2b comparadas com as fêmeas CB10-H2 não-gestantes, porém, estudos adicionais devem ser realizados para elucidar o perfil desse isotipo de imunoglobulina em relação aos camundongos BALB/c e C57BL/6.

Foi previamente demonstrado que a imunidade humoral é importante para o controle da infecção por *T. gondii* (JOHNSON et al.; 1983, KANG et al.; 2000, SAYLES et al.; 2000). Entretanto, neste nosso estudo, os níveis de anticorpos não foram suficientes para conter a infecção pelo *T. gondii* como foi observado pelo parasitismo verificado no cérebro de ambas as linhagens de camundongos. De acordo com nossos resultados, dois grupos de camundongos CBA/J foram infectados com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por gavagem, sendo um grupo tratado com sulfadiazina e outro não tratado. Dois meses após a infecção, o soro obtido dos animais não tratados apresentou títulos de anticorpos IgG, bem como mRNA para SAG-1, significativamente maiores do que os animais tratados, demonstrando que o aumento nos títulos de IgG no soro estão associados com o aumento no número de taquizoítos no cérebro (mensurados pela quantidade de mRNA para SAG-1) durante os estágios tardios da infecção (SINGH et al., 2010).

Nossos resultados indicam que os altos níveis sistêmicos de IL-6, IFN- γ e TNF, principalmente aos 8 dias de gestação e infecção nas fêmeas C57BL/KsJ, bem como a alta expressão de mensagem para IFN- γ na interface materno-fetal e os altos níveis de IFN- γ e TNF nas fêmeas CB10-H2 podem ter provocado os danos gestacionais observados. Em suma os dados sugerem que a ausência de associação do haplotipo do MHC H-2^d, presente em camundongos BALB/c, com o background genético dessa linhagem de camundongo, parece estar envolvida em maior prejuízo gestacional nos casos de toxoplasmose congênita, como foi observado em camundongos CB10-H2 (H-2^b, background genético da linhagem BALB/c) e C57BL/KsJ (H-2^d, background genético da linhagem C57BL/6).

6. Conclusões

- A infecção por *T. gondii* induziu alta taxa de reabsorção embrionária em fêmeas gestantes CB10-H2 e C57BL/KsJ. Os danos gestacionais foram similares para ambas as linhagens de camundongos, uma vez que não houve diferença significativa quanto aos índices de aborto comparados entre as duas linhagens.
- O parasito foi raramente detectado no útero/placenta dos animais CB10-H2 e C57BL/KsJ infectados com *T. gondii*, sendo que esse foi detectado no pulmão dos animais infectados, independente da gestação, e no cérebro principalmente aos 18 dias de infecção, independente da gestação.
- Os danos gestacionais observados durante a infecção por *T. gondii* parecem estar associados com os altos níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IFN- γ e TNF, e locais, INF- γ e TNF nas fêmeas infectadas. Além disso, apesar da expressão de mensagem para FOXP3 e IL-13 no útero/placenta de camundongos CB10-H2 e TGF- β em camundongos C57BL/KsJ, não houve proteção das fêmeas gestantes e infectadas contra os danos gestacionais provocados pela toxoplasmose congênita.
- A progressão da gestação induz redução da migração de mastócitos para o útero/placenta em ambas as linhagens de camundongos, entretanto, a infecção com *T. gondii* mantém o número dessas células nas fêmeas CB10-H2 e C57BL/KsJ, ou mesmo provoca aumento na migração para o útero, como foi observado nas fêmeas da linhagem C57BL/KsJ. Além disso, os mastócitos detectados parecem apresentar

diferentes estágios de ativação nas linhagens CB10-H2 e C57BL/KsJ infectadas, uma vez que expressam quimases (CMA1 e MCPT4) diferencialmente.

- A produção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* no soro foi similar em ambas as linhagens de camundongos, no entanto, as fêmeas CB10-H2 produziram maiores níveis de IgG1 e IgG2a específicos anti-*T. gondii* do que as fêmeas C57BL/KsJ, independentemente da gestação. Ao contrário, as fêmeas C57BL/KsJ apresentaram maiores níveis de IgG2b específico anti-*T. gondii* no soro aos 18 dias de gestação e infecção e níveis significativamente maiores aos 18 dias de infecção quando não gestantes do que as fêmeas CB10-H2 nas mesmas condições. Porém, os níveis de anticorpos detectados não foram suficientes para proteção contra os danos gestacionais em ambas as linhagens.

- A ausência da associação entre o H-2^d presente em camundongos BALB/c e o background genético dessa linhagem pode estar envolvida nos danos gestacionais provocados pela a infecção por *T. gondii* nos camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ.

7. Bibliografia¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade e apresentação de antígenos aos linfócitos T. **In: Imunologia Celular e Molecular**, 8º ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**. V. 188, n. 4, p. 608-616, 2003.

ABONIA, J. P.; FRIEND, D. S.; AUSTEN, W. G. JR.; MOORE, F. D. JR.; CARROLL, M. C.; CHAN, R.; AFNAN, J.; HUMBLE, A.; GERARD, C.; KNIGHT, P.; KANAOKA, Y.; YASUDA, S.; MOROKAWA, N.; AUSTEN, K. F.; STEVENS, R. L.; GURISH, M. F. Mast cell protease 5 mediates ischemia-reperfusion injury of mouse skeletal muscle. **Journal of Immunology**. V. 174, n. 11, p. 7285-7291, 2005.

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infection and Immunity**. V. 72, n. 3, p. 1397-1401, 2004.

ANDERSSON, M. K.; KARLSON, U.; HELLMAN, L. The extended cleavage specificity of the rodent b-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase. **Molecular Immunology**. V. 45, n. 3, p. 766-775, 2008.

ASCHKENAZI, S.; STRASZEWSKI, S.; VERWER, K. M.; FOELLMER, H.; RUTHERFORD, T.; MOR, G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. **Biology of Reproduction**. V. 66, n. 6, p. 1853-1861, 2002.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. V. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**. V. 28, n. 7, p. 624-630, 2007.

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

¹ De acordo com as normas da ABNT (2002).

- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**. V. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.
- BENEVIDES, L.; MILANEZI, C. M.; YAMAUCHI, L. M.; BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; SILVA, N. M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **The American Journal of Pathology**. V. 173, n. 3, p. 741-751, 2008.
- BLANCHARD, N.; SHASTRI, N. Topological journey of parasite-derived antigens for presentation by MHC class I molecules. **Trends in Immunology**. V. 31, n. 11, p. 414-421, 2010.
- BLADER, I. J.; COLEMAN, B. I.; CHEN, C. T.; GUBBELS, M. J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**. V. 69, p. 463-485, 2015.
- BOJAR, I.; SZYMANSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*-state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. V. 17, n. 2, p. 209-214, 2010.
- BOOTHROYD, J. C. Expansion of host ranges as a driving force in the evolution of *Toxoplasma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 104, n. 2, p. 179-184, 2009.
- BOSQUIAZZO, V. L.; RAMOS, J. G.; VARAYOUD, J.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. **Reproduction**. V. 133, n. 5, p. 1045-1055, 2007.
- BROWN, J. K.; KNIGHT, P. A.; WRIGHT, S. H.; THORNTON, E. M.; MILLER, H. R. Constitutive secretion of the granule chymase mouse mast cell protease-1 and the chemokine, CCL2, by mucosal mast cell homologues. **Clinical and Experimental Allergy**. V. 33, n. 1, p. 132-146, 2003.
- BYTAUTIENE, E.; VEDERNIKOV, Y. P.; SAADE, G. R.; ROMERO, G.; GARFIELD, R. E. Endogenous mast cell degranulation modulates cervical contractility in the guinea pig. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. V. 186, n. 3, p. 438-445, 2002.
- BYTAUTIENE, E.; VEDERNIKOV, Y. P.; SAADE, G. R.; ROMERO, R.; GARFIELD, R. E. Degranulation of uterine mast cells modifies contractility of isolated myometrium from pregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. V. 191, n. 5, p. 1705-1710, 2004.
- CARELLOS, E. V.; CAIAFFA, W. T.; ANDRADE, G. M.; ABREU, M. N.; JANUARIO, J. N.; GROUP, U. C. T. B. Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease? **Epidemiology and Infection**. V. 142, n. 3, p. 644-655, 2014a.

- CARELLOS, E. V.; DE ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; JANUARIO, J. N.; ROMANELLI, R. M.; ABREU, M. N.; DA SILVA, F. M.; LOURDES, I. R.; DE ANDRADE, J. Q.; CAIAFFA, W. T.; GROUP, U. C. T. B. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**. V. 9, n. 2, p. e88588, 2014b.
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: A review. **Acta Tropica**. V. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.
- CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblast. **European Journal of Cell Biology**. V. 73, n. 2, p. 114-123, 1997.
- CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**. V. 10, n. 1, p. 83-89, 2007.
- CAUGHEY, G. H.; BEAUCHAMP, J.; SCHLATTER, D.; RAYMOND, W. W.; TRIVEDI, N. N.; BANNER, D.; MAUSER, H.; FINGERLE, J. Guinea pig chymase is leucine-specific: a novel example of functional plasticity in the chymase/granzyme family of serine peptidases. **The Journal of Biology Chemistry**. V. 283, n. 20, p. 13943-13951, 2008.
- CAUGHEY, G. H. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 716, p. 212-234, 2011.
- CHEN, R.; NING, G.; ZHAO, M. L.; FLEMING, M. G.; DIAZ, L. A.; WERB, Z.; LIU, Z. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 108, n. 8, p. 1151-1158, 2001.
- CSABA, G. Mast cell, the peculiar member of the immune system: A homeostatic aspect. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. V. 62, n. 3, p. 207-231, 2015.
- COCCHIARA, R.; LAMPIASI, N.; ALBEGGIANI, G.; AZZOLINA, A.; BONGIOVANNI, A.; GIANAROLI, L.; DI BLASI, F.; GERACI, D. A factor secreted by human embryo stimulates cytokine release by uterine mast cells. **Molecular Human Reproduction**. V. 2, n. 10, p. 781-791, 1996.
- CONG, H.; MUI, E. J.; WITOLA, W. H.; SIDNEY, J.; ALEXANDER, J.; SETTE, A.; MAEWAL, A.; BISSATI, K. E.; ZHOU, Y.; SUZUKI, Y.; LEE, D.; WOODS, S.; SOMMERVILLE, C.; HENRIQUEZ, F. L.; ROBERTS, C. W.; MCLEOD, R. *Toxoplasma gondii* HLA-B*0702-restricted GRA7₂₀₋₂₈ peptide with adjuvants and a universal helper T cell epitope elicits CD8⁺ T cells producing interferon- γ and reduces parasite burden in HLA-B*0702 mice. **Human Immunology**. V. 73, n. 1, p.1-10, 2012.
- COUSSENS, L. M.; RAYMOND, W. W.; BERGERS, G.; LAIG-WEBSTER, M.; BEHRENDTSEN, O.; WERB, Z.; CAUGHEY, G. H.; HANAHAN, D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes & Development**. V. 13, n. 11, p. 1382-1397, 1999.

COUTINHO, L. B.; GOMES, A. O.; ARAÚJO, E. C. B.; BARENCO, P. V. C.; SANTOS, J.; CAIXETA, D. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; FERRO, E. A. V.; SILVA, N. M. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. **International Journal for Parasitology**. V. 42, n. 4, p. 341-352, 2012.

DE GARAVILLA, L.; GRECO, M. N.; SUKUMAR, N.; CHEN, Z. W.; PINEDA, A. O.; MATHEWS, F. S.; DI CERA, E.; GIARDINO, E. C.; WELLS, G. I.; HAERTLEIN, B. J.; KAUFFMAN, J. A.; CORCORAN, T. W.; DERIAN, C. K.; ECKARDT, A. J.; DAMIANO, B. P.; ANDRADE-GORDON, P.; MARYANOFF, B. E. A novel, potent dual inhibitor of the leukocyte proteases cathepsin G and chymase: molecular mechanisms and anti-inflammatory activity in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 280, n. 18, p. 18001-18007, 2005.

DEALTRY, G. B.; O'FARRELL, M. K.; FERNANDEZ, N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **International Archives of Allergy and Immunology**. V. 123, n. 2, p. 107-119, 2000.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPERR, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology Reviews**. V. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. V. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. V. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÉTRE, A.; YEAR, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: Case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. **The Journal of Infectious Diseases**. V. 199, n. 2, p. 280-285, 2009.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**. V. 26, n. 4, p. 190-196, 2010.

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

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases versus local immune tolerance. **Clinical Microbiology Review**. V. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

EVENGARD, B.; PETERSSON, K.; ENGMAN, M. L.; WIKLUND, S.; IVARSSON, S. A.; TEÄR-FAHNEJELM, K.; FORSGREN, M.; GILBERT, R.; MALM, G. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. **Epidemiology and Infection**. V. 127, n. 1, p. 121-127, 2001.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**. V. 18, n. 8, p. 355-359, 2002.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908 – 2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

FERREIRA, I. M.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; HIRAMOTO, R. M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**. V. 118, n. 2, p. 221-227, 2008.

FILISSETTI, D.; COCQUERELLE, V.; PFAFF, A.; VILLARD, O.; CANDOLFI, E. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. V. 29, n. 7, p. 665-667, 2010.

FRANCO, P. S.; DA SILVA, N. M.; DE FREITAS BARBOSA, B.; DE OLIVEIRA GOMES, A.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers in Microbiology**. V. 6, n. 181, 2015.

FU, X.; WU, B.; HUANG, B.; ZHENG, H.; HUANG, S.; GAN, Y.; SHEN, J.; LUN, Z. R.; LU, F. The correlation of Tim-3 and IFN- γ expressions in mice infected with *Toxoplasma gondii* during gestation. **Parasitology Research**. V. 114, n. 1, p. 125-132, 2015.

FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T. Role of cytokines and major histocompatibility complex restrictin in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. V. 71, n. 11, p. 6392-6401, 2003.

GALISTEU, K. J.; MATTOS, C. B.; LELIS, A. G. L.; OLIVEIRA, M. P.; SPEJORIM, L. F.; JORDÃO, P.; ZAGO, A. P.; CURY, P. M.; MATTOS, L. C.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**. V. 9, p. 24-29, 2007.

GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M.; TSAI, M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annual Review of Immunology**. V. 23, p. 749-786, 2005.

GALLWITZ, M.; HELLMAN, L. Rapid lineage-specific diversification of the mast cell chymase locus during mammalian evolution. **Immunogenetics**. V. 58, n. 8, p. 641-654, 2006.

GARFIELD, R. E.; IRANI, A. M.; SCHWARTZ, L. B.; BYTAUTIENE, E.; ROMERO, R. Structural and functional comparison of mast cells in the pregnant versus nonpregnant human uterus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. V. 194, n. 1, p. 261-267, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**. V. 146, n. 1, p. 286-292, 1991.

GE, Y. Y.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; WU, J. P.; TAN, M. J.; HU, W.; LIANG, Y. J.; WANG, Y. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells. **Parasite Immunology**. V. 30, n. 9, p. 471-481, 2008.

GRECO, M. N.; HAWKINS, M. J.; POWELL, E. T.; ALMOND, H. R. JR.; DE GARAVILLA, L.; HALL, J.; MINOR, L. K.; WANG, Y.; CORCORAN, T. W.; DI CERA, E.; CANTWELL, A. M.; SAVVIDES, S. N.; DAMIANO, B. P.; MARYANOFF, B. E. Discovery of potent, selective, orally active, nonpeptide inhibitors of human mast cell chymase. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 50, n. 8, p. 1727-1730, 2007.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**. V. 294, n. 5540, p. 161-165, 2001.

GU, Y.; YANG, D. K.; SPINAS, E.; KRITAS, S. K.; SAGGINI, A.; CARAFFA, A.; ANTINOLFI, P.; SAGGINI, R.; CONTI, P. Role of TNF in mast cell neuroinflammation and pain. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**. V. 29, n. 4, p. 787-791, 2015.

GURISH, M. F.; GHILDYAL, N.; MCNEIL, H. P.; AUSTEN, K. F.; GILLIS, S.; STEVENS, R. L. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 175, n. 4, p. 1003-1012, 1992.

HERYANTO, B.; ROGERS, P. A. Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. **Reproduction**. V. 123, n. 1, p. 107-113, 2002.

HIDE, G.; MORLEY, E. K.; HUGUES, J. M.; GERWASH, O.; ELMAHAISHI, M. S.; ELMAHAISHI, K. H.; THOMASSON, D.; WRIGHT, E. A.; WILLIAMS, R. H.; MURPHY, R. G.; SMITH, J. E. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. V. 136, n. 14, p. 1877-1885, 2009.

HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. V. 64, n. 12, p. 5193-5198, 1996.

HOWE, D. K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; MCINTIRE, R. H.; OBER, C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **FASEB Journal**. V. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.

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

JANEWAY, C. A. Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection/Institut Pasteur**. V. 3, n. 13, p. 1167-1171, 2001.

JOACHIM, R. A.; HILDEBRANDT, M.; ODER, J.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8⁺ TNF- α ⁺ decidual cells via substance P. **American Journal of Reproductive Immunology**. V. 45, n. 5, p. 303-309, 2001.

JOHNSON, A. M.; MCDONALD, P. J.; NEOH, S. H. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. **The Journal of Protozoology**. V. 30, n. 2, p. 351-356, 1983.

JONES, J. S.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical and Gynecological Survey**. V. 56, n. 5, p. 296-305, 2001a.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M.; MCQUILLAN, G.; NAVIN, T.; MCAULEY, J. B. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. **American Journal of Epidemiology**. V. 154, n. 4, p. 357-365, 2001b.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. **Experimental Parasitology**. V. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

JU, H.; GROS, R.; YOU, X.; TSANG, S.; HUSAIN, M.; RABINOVITCH, M. Conditional and targeted overexpression of vascular chymase causes hypertension in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. V. 98, n. 13, p. 7469-7474, 2001.

KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- γ , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase. **Journal of Immunology**. V. 164, n. 5, p. 2629-2634, 2000.

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

KNIGHT, P. A.; WRIGHT, S. H.; LAWRENCE, C. E.; PATERSON, Y. Y.; MILLER, H. R. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 192, n. 12, p. 1849-1856, 2000.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. **Molecular Immunology**. V. 48, n. 1-3, p. 14-25, 2010.

LAGO, E. G.; NETO, E. C.; MELAMED, J.; RUCKS, A. P.; PRESOTTO, C.; COELHO, J. C.; PARISE, C.; VARGAS, P. R.; GOLDBECK, A. S.; FIORI, R. M. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**. V. 21, n. 6, p. 525-531, 2007.

LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cellular Microbiology**. V. 8, n. 10, p. 1611-1623, 2006.

LANG, C.; ALGNER, M.; BEINERT, N.; GROSS, U.; LUDER, C. G. Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. **Microbes and Infection/Institut Pasteur**. V. 8, n. 8, p. 1994-2005, 2006.

LAO, K.; ZHAO, M.; LI, Z.; LIU, X.; ZHANG, H.; JIANG, Y.; WANG, Y.; HU, X. IL-10 regulate decidual Tregs apoptosis contributing to the abnormal pregnancy with *Toxoplasma gondii* infection. **Microbial Pathogenesis**. V. 89, p. 210-216, 2015.

LEE, D. M.; FRIEND, D. S.; GURISH, M. F.; BENOIST, C.; MATHIS, D.; BRENNER, M. B. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. **Science**. V. 297, n. 5587, p. 1689-1692, 2002.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHI, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.

LEROUX, L. P.; NISHI, M.; EL-HAGE, S.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; DZIERZINSKI, F. S. Parasite manipulation of the invariant chain and the peptide editor h2-dm affects major histocompatibility complex class II antigen presentation during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**. V. 83, n. 10, p. 3865-3880, 2015a.

LEROUX, L. P.; DASANAYAKE, D.; ROMMEREIM, L. M.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; JARDIM, A.; DZIERZINSKI, F. S. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. **International Journal for Parasitology**. V. 45, n. 5, p. 319-332, 2015b.

LI, M.; LIU, K.; MICHALICEK, J.; ANGUS, J. A.; HUNT, J. E.; DELL'ITALIA, L. J.; FENELEY, M. P.; GRAHAM, R. M.; HUSAIN, A. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 114, n. 1, p. 112-120, 2004.

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

LIN, L.; BANKAITIS, E.; HEIMBACH, L.; LI, N.; ABRINK, M.; PEJLER, G.; AN, L.; DIAZ, L. A.; WERB, Z.; LIU, Z. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 286, n. 43, p. 37358-37367, 2011.

LIU, Y.; ZHAO, M.; XU, X.; LIU, X.; ZHANG, H.; JIANG, Y.; ZHANG, L.; HU, X. Adoptive transfer of Treg cells counters adverse effects of *Toxoplasma gondii* infection on pregnancy. **The Journal of Infection Diseases**. V. 210, n. 9, p. 1435-1443, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. **Methods**. V. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; FERRO, E. A.; PENA, H. F.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**. p. 1-11, 2016.

LUDER, C. G.; LANG, T.; BEUERLE, B.; GROSS, U. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Experimental Immunology**. V. 112, n. 2, p. 308-316, 1998.

LUDER, C. G.; WALTER, W.; BEUERLE, B.; MAEURER, M. J.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1α. **European Journal of Immunology**. V. 31, n. 5, p. 1475-1484, 2001.

LUDER, C. G.; LANG, C.; GIRALDO-VELASQUEZ, M.; ALGNER, M.; GERDES, J.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. **Journal of Neuroimmunology**. V. 134, n. 1-2, p. 12-24, 2003.

LUNDERIUS-ANDERSSON, C.; ENOKSSON, M.; NILSSON, G. Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33. **Frontiers in Immunology**. V. 3, n. 82, 2012.

LUNDEQUIST, A.; PEJLER, G. Biological implications of preformed mast cell mediators. **Cellular and Molecular Life Science**. V. 68, n. 6, p. 965-975, 2011.

MAO, H.; HU, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; HU, Y.; CHI, Y.; Influence of the *Toxoplasma gondii* infection in rats during early pregnancy on the expression levels of IL-4, IL-10 and IFN-γ in placenta. **Current Immunology**. V. 5, p. 386-391, 2007.

MARX, L.; ARCK, P.; KIESLICH, C.; MITTELRECHNER S.; KAPP, M.; DIETL, J. Decidual mast cells might be involved in the onset of human first-trimester abortion. **American Journal of Reproductive Immunology**. V. 41, n. 1, p. 34-40, 1999.

MATSUGUCHI, T. Mast cells as critical effectors of host immune defense against Gram-negative bacteria. **Current Medicinal Chemistry**. V. 19, n. 10, p. 1432-1442 2012.

MCKEE, A. S.; DZIERZINSKI, F.; BOES, M.; ROOS, D. S.; PEARCE, E. J. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**. V. 173, n. 4, p. 2632-2640, 2004.

MELLON, M. B.; FRANK, B. T.; FANG, K. C. Mast cell alpha-chymase reduces IgE recognition of birch pollen profilin by cleaving antibody-binding epitopes. **Journal of Immunology**. V. 168, n. 1, p. 290-297, 2002.

METZ, M.; PILIPONSKY, A. M.; CHEN, C. C.; LAMMEL, V.; ABRINK, M.; PEJLER, G.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. **Science**. V. 313, n. 5786, p. 526-530, 2006.

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

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TAPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia. EDUFU, 273p, 2005.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. V. 363, n. 9425, p. 1965-1979, 2004.

MORDUE, D. G.; HAKANSSON, S.; NIESMAN, I.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. **Experimental Parasitology**. V. 92, n. 2, p. 87-99, 1999.

NISHIMOTO, M.; TAKAI, S.; KIM, S.; JIN, D.; YUDA, A.; SAKAGUCHI, M.; YAMADA, M.; SAWADA, Y.; KONDO, K.; ASADA, K.; IWAO, H.; SASAKI, S.; MIYAZAKI, M. Significance of chymase-dependent angiotensin II-forming pathway in the development of vascular proliferation. **Circulation**. V. 104, n. 11, p. 1274-1279, 2001.

PEJLER, G.; RÖNNBERG, E.; WAERN, I.; WERNERSSON, S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**. V. 115, n. 24, p. 4981-4990, 2010.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**. V. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PFAFF, A. W.; CANDOLFI, E. New insights in toxoplasmosis immunology during pregnancy. Perspective for vaccine prevention. **Parassitologia**. V. 50, n. 1-2, p. 55-58, 2008.

PRABHUDAS, M.; BONNEY, E.; CARON, K.; DEY, S.; ERLEBACHER, A.; FAZLEABAS, A.; FISHER, S.; GOLOS, T.; MATZUK, M.; MCCUNE, J. M.; MOR, G.; SCHULZ, L.; SOARES, M.; SPENCER, T.; STROMINGER, J.; WAY, S. S.; YOSHINAGA, K. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. **Nature Immunology**. V. 16, n. 4, p. 328-343, 2015.

PURCELL, W. M.; HANAHOE, T. H. A novel source of mast cells: the human placenta. **Agents and Actions**. V. 33, n. 1-2, p. 8-12, 1991.

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

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; WILSON, C. B.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis, in **Infectious Diseases of the Fetus and New born Infant**. 7th, p. 918-1041, 2011.

RESENDE, M. G.; FUX, B.; CAETANO, B. C.; MENDES, E. A.; SILVA, N. M.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T. The role of MHC h2^d/h2^b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V. 80, n. 1, p. 85-99, 2008.

ROBERT-GANGNEUX, F.; MURAT, J. B.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; GANGNEUX, J. P.; PELLOUX, H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**. V. 27, n. 12, p. 530-536, 2011a.

ROBERT-GANGNEUX, F.; GANGNEUX, J. P.; VU, N.; JAILLARD, S.; GUIGUEN, C.; AMIOT, L. High level of soluble HLA-G in amniotic fluid is correlated with congenital transmission of *Toxoplasma gondii*. **Clinical Immunology**. V. 138, n. 2, p. 129-134, 2011b.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**. V. 21, n. 4, p. 458-472, 2006.

RUDOLPH, M. I.; REINICKE, K.; CRUZ, M. A.; GALLARDO, V.; GONZALEZ, C.; BARDISA, L. Distribution of mast cells and the effect of their mediators on contractility in human myometrium. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**. V. 100, n. 12, p. 1125-1130, 1993.

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

SAKAGUCHI, M.; TAKAI, S.; JIN, D.; OKAMOTO, Y.; MURAMATSU, M.; KIM, S.; MIYAZAKI, M. A specific chymase inhibitor, NK3201, suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. **European Journal of Pharmacology**. V. 493, n. 1-3, p. 173-176, 2004.

- SAYLES, P. C.; GIBSON, G. W.; JOHNSON, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. V. 68, n. 3, p. 1026-1033, 2000.
- SECOR, V. H.; SECOR, W. E.; GUTEKUNST, C. A.; BROWN, M. A. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 191, n. 5, p. 813-822, 2000.
- SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 50, p. 50 – 53, 2004a.
- SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13 – 17, 2004b.
- SENEGAS, A.; VILLARD, O.; NEUVILLE, A.; MARCELLIN, L.; PFAFF, A. W.; STEINMETZ, T.; MOUSLI, M.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon-gamma-induced apoptosis and spiral artery dilation at the materno-foetal interface. **International Journal for Parasitology**. V. 39, n. 4, p. 481-487, 2009.
- SHARMA, P.; CHITNIS, C. E.; Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Current Opinion in Microbiology**. V. 16, n. 4, p. 432-437, 2013.
- SHIN, K.; WATTS, G. F.; OETTGEN, H. C.; FRIEND, D. S.; PEMBERTON, A. D.; GURISH, M. F.; LEE, D. M. Mouse mast cell tryptase mMCP-6 Is a critical link between adaptive and innate Immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* Infection. **Journal of Immunology**. V. 80, p. 4885-4891, 2008.
- SHIONO, Y.; MUN, H. S.; HE, N.; NAKAZAKI, Y.; FANF, H.; FURUYA, M.; AOSAI, F.; YANO, A. Maternal-fetal transmission of *T. gondii* in IFN- γ deficient pregnant mice. **Parasitology International**. V. 56, n. 2, p. 141-148, 2007.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. V. 359, n. 6390, p. 82-85, 1992.
- SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological Reviews**. V. 240, n. 1, p. 72-91, 2011.
- SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C. M.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: The role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**. V. 123, n. 1, p. 65-72, 2009.
- SILVEIRA, C.; FERREIRA, R.; MUCCIOLI, C.; NUSSENBLATT, R.; BELFORT, R. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **American Journal of Ophthalmology**. V. 136, n. 2, p. 370-371, 2003.

SINGH, J.; GRANIELLO, C.; NI, Y.; PAYNE, L.; SA, Q.; HESTER, J.; SHELTON, B. J.; SUZUKI, Y. *Toxoplasma* IgG and IgA, but not IgM, antibody titers increase in sera of immunocompetent mice in association with proliferation of tachyzoites in the brain during the chronic stage of infection. **Microbes and Infection**. V. 12, p. 1252-1257, 2010.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**. V. 236, n. 4804, p. 944-947, 1987.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**. V. 240, n. 4851, p. 516-518, 1988.

STEVENS, R. L.; ADACHI, R. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. **Immunological Review**. V. 217, p. 155-167, 2007.

SVENSSON-ARVELUND, J.; MEHTA, R. B.; LINDAU, R.; MIRRASEKHIAN, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BERG, G.; LASH, G. E.; JENMALM, M. C.; ERNERUDH, J. The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. **Journal of Immunology**. V. 194, n. 4, p. 1534-1544, 2015.

SZELAG, A.; MERWID-LAD, A.; TROCHA, M. Histamine receptors in the female reproductive system. Part I. Role of the mast cells and histamine in female reproductive system. **Ginekologia Polska**. V. 73, n. 7, p. 627-635, 2002a.

SZELAG, A.; MERWID-LAD, A.; TROCHA, M. Histamine receptors in the female reproductive system. Part II. The role of histamine in the placenta, histamine receptors and the uterus contractility. **Ginekologia Polska**. V. 73, n. 7, p. 636-644, 2002b.

TCHOUGOUNOVA, E.; PEJLER, G.; ABRINK, M. The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 198, n. 3, p. 423-431, 2003.

TCHOUGOUNOVA, E.; LUNDEQUIST, A.; FAJARDO, I.; WINBERG, J. O.; ABRINK, M.; PEJLER, G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. **The Journal of Biology Chemistry**. V. 280, n. 10, p. 9291-9216, 2005.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**. V. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TRIVEDI, N. N.; CAUGHEY, G. H. Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. V. 42, n. 3, p. 257-267, 2010.

- UNNO, A.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitology International**. V. 57, n. 4, p. 515-518, 2008.
- UNNO, A.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Up-regulation of hyaluronate receptors in *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 391, n. 1, p. 477-480, 2010.
- VARAYOUD, J.; RAMOS, J. G.; BOSQUIAZZO, V. L.; MUNOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. **Reproduction**. V. 127, n. 3, p. 379-387, 2004.
- WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B. S.; DREW, M. E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**. V. 71, n. 7, p. 1245-1263, 2014.
- WOIDACKI, K.; JENSEN, F.; ZENCLUSSEN, A. C. Mast cells as novel mediators of reproductive processes. **Frontiers in Immunology**. V. 4, n. 29, 2013.
- YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews. Immunology**. V. 14, n. 2, p. 109-121, 2014.
- ZENCLUSSEN, A. C.; JOACHIM, R.; HAGEN, E.; PEISER, C.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion. **Scandinavian Journal of Immunology**. V. 55, n. 6, p. 560-569, 2002.
- ZHANG, Y. H.; HU, X. M.; ZHANG, Q.; MAO, H.; HU, Y.; CHI, Y.; LIU, X. Effect of infection with *Toxoplasma gondii* on the expression levels of maternofetal interface cytokine transcription. **Current Immunology**. V. 5, p. 377-381, 2006.
- ZHANG, R.; ZHANG, H.; LIU, X.; FU, Q.; XU, X.; HU, X. The immunoprotective role of interleukin-10 in abnormal pregnancy outcome induced by *Toxoplasma gondii* infection. **Gynecologic and Obstetric Investigation**. V. 73, n. 3, p. 223-229, 2012a.
- ZHANG, H.; HU, X.; LIU, X.; ZHANG, R.; FU, Q.; XU, X. The Treg/Th17 imbalance in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice. **American Journal of Reproductive Immunology**. V. 67, n. 2, p. 112-121, 2012b.
- ZHANG, L.; ZHAO, M.; JIAO, F.; XU, X.; LIU, X.; JIANG, Y.; ZHANG, H.; OU, X.; HU, X. Interferon gamma is involved in apoptosis of trophoblast cells at the maternal-fetal interface following *Toxoplasma gondii* infection. **International Journal of Infectious Diseases**. V. 30, p. 10-16, 2015.

ANEXO I



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

ANÁLISE FINAL Nº 046/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 113/11

Projeto Pesquisa: "Papel do Haplotipo do Complexo Principal de
istocompatibilidade na suscetibilidade de camundongos à infecção congênita
por *Toxoplasma gondii*."

Pesquisador Responsável: Profa. Dra Neide Maria da Silva

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO.
O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 13 de Junho de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenadora *Pro tempore* da CEUA/UFU