

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas
(PPGBC)

**A susceptibilidade à infecção pelas cepas ME49 e RH de *Toxoplasma gondii*
é dependente de ciclooxygenases em modelo experimental *Calomys callosus***

ANA CAROLINA DE ALCÂNTARA PEREIRA

**Uberlândia
Abril-2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas
(PPGBC)

**A susceptibilidade à infecção pelas cepas ME49 e RH de *Toxoplasma gondii*
é dependente de ciclooxygenases em modelo experimental *Calomys callosus***

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

ANA CAROLINA DE ALCÂNTARA PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
Co-orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia
Abril-2016

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

P436s
2016 Pereira, Ana Carolina de Alcântara, 1987
 A susceptibilidade à infecção pelas cepas ME49 e RH de
Toxoplasma gondii é dependente de ciclooxigenases em modelo
experimental *Calomys callosus* / Ana Carolina de Alcântara Pereira. -
2016.
 76 f. : il.

Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa.

Coorientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.751>

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Oxigenase -
Teses. 4. Toxoplasmose - Teses. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983- II.
Ferro, Eloisa Amália Vieira. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
IV. Título.

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número:003/2016 do PPGBC

Data: 29 de Abril de 2016

Discente: Ana Carolina de Alcântara Pereira

Matrícula nº 11412BCE007

Título do Trabalho: "A susceptibilidade à infecção pelas cepas ME49 e RH de *Toxoplasma gondii* é dependente de ciclooxigenase-2 (COX-2) em modelo experimental *Calomys callosus*"

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Biologia da Reprodução

Projeto de Pesquisa vinculado: -----

Às oito horas do dia vinte e nove de abril do ano de 2016 na Sala 6T 210, Bloco 6T - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professoras Doutoras: Angélica de Oliveira Gomes - UFTM/Uberaba; Mariana Bodini Angeloni – Unipac/Uberlândia e Bellisa de Freitas Barbosa orientadora da candidata. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Anã Carolina de Alcântara Pereira aprovada. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho:

A susceptibilidade à infecção pelas cepas ME49 e RH de *T. gondii* é dependente de ciclooxigenase-2 em modelo experimental *Calomys callosus*

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18 horas e 40 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Angélica de O. Gomes
 Profa. Dra. Angélica de Oliveira Gomes
 UFTM/Uberaba

Mariana Bodini Angeloni
 Profa. Dra. Mariana Bodini Angeloni
 Unipac Uberlândia

Bellisa de F. Barbosa
 Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - Orientadora
 UFU Uberlândia

Agradecimentos

Primeiramente eu queria agradecer a Deus pelo dom maravilhoso da vida, pois se não fosse ele eu não estaria aqui realizando esse estudo.

O mestrado foi uma lição e uma etapa muito importante na minha vida acadêmica, com alguns obstáculos e dificuldades. Dedico essa conquista a minha família que sempre esteve ao meu lado, minha mãe Maria d'Arc por sempre me incentivar e me motivar nos momentos em que pensava em desistir.

Agradeço aos meus amigos: Bianka Rodrigues, Eliezer Lucas, Kleber Resende, Bernardo Resende, Tafarel, Nathália Franco e Izadora Cortês por estarem sempre ao meu lado, aguentando todas as minhas chatices, reclamações e principalmente acreditando na minha capacidade.

Um agradecimento especial vai para minha orientadora professora Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, pois acreditou em mim e que eu seria capaz, esteve presente em todos os momentos se mostrando amiga e também uma excelente profissional. Um muito obrigada a todas as meninas do laboratório, as quais tenho muito carinho e respeito. Em especial a Dra. Priscila Silva Franco pessoa de um caráter admirável, ótima profissional e que foi meu braço direito durante esta jornada.

Agradecimento fundamental a professora Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro que abriu as portas do laboratório sem ao menos me conhecer e apostou muitas fichas em meu trabalho, uma pessoa da qual tenho muita admiração e respeito. Obrigada ao PPIPA, em especial ao Professor Mineo por abrir as portas do laboratório oferecendo toda ajuda necessária.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro, em especial à CAPES pela concessão da bolsa do mestrado.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório que infecta uma ampla variedade de vertebrados de sangue quente, incluindo seres humanos. Muitos estudos demonstram que a ciclooxigenase-2 (COX-2) é um potente modulador da resposta imune em vários tipos de infecção. No entanto, o papel da ciclooxigenase ainda não é claro durante uma infecção causada por *T. gondii*. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi verificar o papel funcional da COX-2 em roedores *Calomys callosus* infectados por *T. gondii*, um excelente modelo experimental *in vivo* tradicionalmente utilizado para estudar a toxoplasmose. Para este fim, fêmeas de *C. callosus* foram infectadas com cinquenta cistos de *T. gondii* (cepa ME49), tratadas com inibidores da ciclooxigenase Meloxicam (inibidor de COX-1 e COX-2) e Celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2), e avaliadas a cada 48 horas para a verificação da alteração de peso corporal e morbidade durante 40 dias consecutivos. Como controle, os animais foram infectados e não tratados com inibidores da ciclooxigenase. Depois de 40 dias de infecção, os cérebros foram coletados e processados para imuno-histoquímica ou PCR em tempo real para detecção de *T. gondii*, enquanto o soro dos animais foi avaliado para detecção de citocinas. Além disso, macrófagos peritoneais de *C. callosus* não infectados ou infectados com a cepa RH de *T. gondii* foram tratados com Meloxicam ou Celecoxibe a fim de avaliar a proliferação intracelular do parasito por ensaio de beta-galactosidase, produção de citocinas por ELISA e produção de nitrito por meio do método de Griess, após 24 h de infecção. Os resultados mostraram que a morbidade dos animais foi alterada após a infecção por *T. gondii*, independentemente do tratamento. Em relação à alteração de peso corporal, animais tratados com Celecoxibe apresentaram uma perda de peso menor quando comparados com seu respectivo controle. A imuno-histoquímica e PCR em tempo real realizados no tecido cerebral mostraram uma redução significativa de cistos teciduais em animais tratados com ambos os inibidores, quando comparados com animais infectados e não tratados. Além disso, observou-se que ambos os tratamentos com os inibidores foram capazes de controlar a proliferação intracelular de *T. gondii* em macrófagos peritoneais. No soro de *C. callosus*, os dados do ELISA mostraram que animais tratados com Meloxicam apresentaram uma tendência para maior produção de MIF quando comparados ao controle. Já no sobrenadante de macrófagos peritoneais, houve um aumento na produção de TNF- α e uma redução de IL-6, e o ensaio de Griess demonstrou que ambos os tratamentos induziram uma alta produção de nitrito. Todos estes resultados indicam que as ciclooxigenases são capazes de aumentar a susceptibilidade a infecção por *T. gondii*, uma vez que a inibição destes mediadores induz o controle significativo da infecção. Em conclusão, os nossos resultados mostram que a COX-1 e COX-2 são importantes para aumentar o processo infeccioso por *T. gondii* no cérebro e macrófagos peritoneais de *C. callosus*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Calomys callosus*, Ciclooxigenases

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite that infects a wide range of warm-blooded vertebrates, including humans. Many studies show that the cyclooxygenase-2 (COX-2) is a potent modulator of immune response in multiple types of infection. However, the role of cyclooxygenase during an infection by *T. gondii* is still not clear. Therefore, the aim of this study was to investigate the functional role of COX-2 in *Calomys callosus* rodents infected with *T. gondii*, an excellent in vivo experimental model traditionally used for studying toxoplasmosis. For this purpose, *C. callosus* females were infected with fifty cysts of *T. gondii* (ME49 strain), treated with cyclooxygenase inhibitors as Meloxicam, COX-1 and COX-2 inhibitor, and Celecoxib, COX-2 selective inhibitor, and evaluated every 48 hours to check the body weight change and morbidity for 40 consecutive days. As a control, the animals were infected and not treated with cyclooxygenase inhibitors. After 40 days of infection was performed collection and processing of the brains for immunohistochemistry or real-time PCR for the detection of *T. gondii*, while evaluating the serum of animals for the detection of cytokines by ELISA. Furthermore, the peritoneal macrophages of *C. callosus*, uninfected or infected with *T. gondii* RH strain, were treated with Meloxicam or Celecoxib in order to evaluate the parasite intracellular proliferation by beta-galactosidase assay, and the supernatant was collected for cytokine detection by ELISA and production of nitrite by Griess method, after 24h of infection. The results showed that the morbidity of the animals changed after infection by *T. gondii*, regardless of both treatments. Regarding the change in body weight, animals treated with Celecoxib had a smaller loss of weight when compared to their respective control. Immunohistochemistry and real-time PCR performed on brain tissue showed a significant reduction of tissue cysts in animals treated with both inhibitors when compared to infected and untreated animals. Besides, it was observed that both treatments with the inhibitors were able to control the *T. gondii* intracellular proliferation in peritoneal macrophages. On the serum of *C. callosus*, the ELISA data shows that animals treated with Meloxicam showed a tendency to increase the MIF production when compared to the PBS control. In the supernatant of peritoneal macrophages, there was an increase in TNF- α production and IL-6 reduction, and Griess assay showed that both treatments induced a high production of nitrite. All these results indicate that cyclooxygenases are capable of favoring infection by *T. gondii*, since inhibition of these mediators induced significant control of infection. In conclusion, our results show that COX-1 and COX-2 are important to facilitate the *T. gondii* infection in the brain and peritoneal macrophages of *C. callosus*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Calomys callosus*, Cyclooxygenases

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico
ABC: complexo avidina biotina
AINEs: antiinflamatórios não esteroides
BeWo: célula de linhagem trofoblástica humana
BSA: soro albumina bovina
cAMP: adenosina monofosfato cíclico
COX: enzima ciclooxigenase
CL: corpo lipídico
DAB: solução de diaminobenzidina
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidade óptica
EP: receptores de prostaglandina
ERK: quinase regulada por sinais extracelulares
ELISA: ensaio imunoenzimático
H₂O₂: água oxigenada
H₂O: água
H₃PO₄: ácido fosfórico
IDO: indoleamina 2,3 dioxygenase
IFN- γ : interferon gama
IgG: imunoglobulina G
IL: interleucina
LPS: lipopolissacarídeo
MAPKs: proteína quinase ativada por mitogeno
MCP-1: proteína quimiotática para monócito 1
MHC: molécula de histocompatibilidade
MIC: proteína de micronema
MIF: fator de inibição da migração de macrófagos
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo
MYD88: “*myeloid differentiation primary response gene 88*”
NaNO₂: nitrito de sódio
NK: célula “natural killer”
NLRs: “*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing proteins*”
NO: óxido nítrico
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PG: prostaglandina
PKA/CREB: proteína quinase ativada por AMPc
qRT-PCR: *real time PCR*
ROP: proteína de ropria
SDS: dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição
TCD4+: linfócitos T *help*
TCD8+: linfócitos T citotóxicos
TLR: “*toll like receptors*”
TMB: 3,3',5,5' tetramethylbenzidine
TNF: fator de necrose tumoral
VP: vacúolo parasitóforo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : epidemiologia e interação parasito-hospedeiro.....	9
1.2. Ciclo biológico e mecanismos de transmissão.....	12
1.3. Cepas de <i>T. gondii</i> e a toxoplasmose.....	15
1.4. <i>Calomys callosus</i>	16
1.5. Resposta imune a <i>T. gondii</i>	17
1.6. Ciclooxigenase e mediadores lipídicos.....	22
1.7. Ciclooxigenase, PGE2 e infecções causadas por patógenos.....	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Animais de experimentação.....	30
4.2. Manutenção das cepas de <i>T. gondii</i> : ME49 e RH.....	30
4.3. Grupo experimental: tratamento com inibidores de ciclooxigenase.....	31
4.4. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	32
4.5. Imuno-histoquímica.....	32
4.6. Ensaio de viabilidade celular – MTT.....	33
4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e MIF em amostras de soro de <i>C. callosus</i>	34
4.8. Tratamento e infecção de macrófagos peritoneais.....	34
4.9. Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em macrófagos peritoneais tratadas com inibidores de COX.....	35
4.10. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para IL-6, MIF, TNF- α e IL-1 β em sobrenadante de macrófagos peritoneais.....	36
4.11. Dosagem de nitrito.....	37
4.12. Análise estatística.....	37
4.13. Normas de biossegurança.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Fêmeas infectadas pela cepa ME49 de <i>T. gondii</i> e tratadas com Celecoxibe perdem menos peso corporal.....	38
5.2. A inibição de COX1 ou COX2 reduz significativamente o parasitismo cerebral em <i>C. callosus</i> infectados pela cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	38
5.3. Maior produção de MIF em fêmeas infectadas pela cepa ME49 de <i>T. gondii</i> e tratadas com Meloxicam.....	39
5.4. O tratamento de macrófagos peritoneais de <i>C. callosus</i> com inibidores de COX não induz alteração da viabilidade celular.....	40

5.5. Inibidores de COX reduzem significativamente a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> (cepa RH) em macrófagos peritoneais de <i>C. callosus</i>	40
5.6. Inibidores de COX induzem maior produção de TNF- α e menor produção de IL-6.....	41
5.7. Inibidores de COX aumenta a produção de nitrito em macrófagos peritoneais de <i>C. callosus</i>	42
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	49
FIGURAS	50
REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: epidemiologia e interação parasito-hospedeiro

A toxoplasmose é uma infecção causada por um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa denominado *Toxoplasma gondii*. Este parasito apresenta uma ampla distribuição mundial e, embora tenha sido descoberto há mais de um século, seu ciclo de vida e sua importância clínica passaram a ser elucidados somente nos últimos quarenta anos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). *T. gondii* é capaz de infectar quase todas as células de animais vertebrados de sangue quente, incluindo aves e a espécie humana (DUBEY; BEATIE, 1988).

Estima-se que aproximadamente um terço da população humana já entrou em contato com *T. gondii*, caracterizando esta infecção como cosmopolita (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; SIACHOQUE *et al.*, 2006; BLADER; SAEIJ, 2009). A soroprevalência varia entre os diversos países, dentro de um mesmo país ou até mesmo entre comunidades diferentes de uma mesma região (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). Baixa prevalência de *T. gondii* é encontrada na América do Norte, nordeste da Europa e sudeste da Ásia, atingindo no máximo 30% da população destes locais. Por outro lado, alta prevalência é observada na América do Sul e países africanos (ROBERT-GANGNEUX, 2014). Inúmeros fatores de risco estão associados com a prevalência da infecção em diversas partes do mundo, como fator climático, que pode influenciar na sobrevivência de oocistos no solo, os hábitos culinários, baixo nível socioeconômico, questões culturais e a precariedade no saneamento básico (ROBERT-GANGNEUX, 2014).

No Brasil, de um modo geral, a infecção por *T. gondii* é altamente prevalente, acometendo em torno de 50% de crianças em idade escolar e até 80% de mulheres em idade reprodutiva (DUBEY *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que a prevalência de *T. gondii* é diversificada dentro do Brasil. No estado de Santa Catarina, por exemplo, 16% das mulheres gestantes apresentam sorologia positiva para o parasito, especificamente anticorpos da classe IgG (QUADROS *et al.*, 2015). Por outro lado, estudos com quatro populações ribeirinhas do estado do Amazonas revelaram que 56,7% destas populações, com idade entre 1 e 85 anos, apresentavam sorologia positiva para *T. gondii*, e que galinhas caipiras destas regiões possuíam o coração e o cérebro infectados com cepas recombinantes do parasito (VITALIANO *et al.*, 2015). No estado de Minas Gerais, um recente trabalho detectou 0,13% de infecções congênitas distribuídas nos

vários municípios do estado (CARELLOS *et al.*, 2014). Os principais fatores de risco associados com a transmissão transplacentária do parasito em Minas Gerais foram o contato íntimo ou indireto das gestantes com gatos domésticos infectados, o contato destas gestantes com o solo sem uso de luvas, o consumo de carne mal passada fresca e as condições socioeconômicas, pois nas áreas rurais o saneamento básico ainda se encontra precário. Além disso, a maior taxa de infecção congênita surgiu entre mães mais jovens e relativamente leigas com relação às formas preventivas da toxoplasmose durante a gestação (CARELLOS *et al.*, 2014). Na cidade de Uberlândia, a ocorrência de toxoplasmose congênita equivale a 0,5% e praticamente todos os casos positivos foram diagnosticados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (SILVA-SEGUNDO *et al.*, 2004). Assim, o estabelecimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que possam controlar a infecção sistêmica ou a transmissão vertical de *T. gondii* é de extremo interesse para o nosso país e também para o mundo, uma vez que reduziria a infecção e, simultaneamente, diminuiria os sintomas ou as manifestações graves da infecção nas crianças, bem como as taxas de aborto.

T. gondii se assemelha morfológicamente com as demais células eucariontes, possuindo núcleo, mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomos (BLADER; SAEIJ, 2009). Além destas, a região anterior do parasito localiza-se o complexo apical constituído por organelas características de indivíduos pertencentes ao filo Apicomplexa, como: conóide, anel polar, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (NEVES, 2003).

Micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas, estando localizadas na região apical do parasito e abaixo do complexo da membrana interna (FOURMAUX *et al.*, 1996; MEISSNER *et al.*, 2002; SAOUROS *et al.*, 2005). Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfícies da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; NEVES, 2005). Inúmeras proteínas de micronemas já foram descritas, sendo que a MIC-1, MIC-4 e MIC-6 são secretadas e funcionam como adesinas no momento em que ocorre a formação do vacúolo parasitóforo. Já a proteína MIC-2 está presente em todos os estágios invasivos do parasito e possui um importante papel no conhecimento da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004). Estudos indicaram ainda que a ligação de proteínas das micronemas aos receptores da célula hospedeira desencadeia a secreção de proteínas das roptrias (SINGH *et al.*, 2010).

Roptrias estão localizadas na região anterior do núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas (LYCKE;

CARLBERG; NORRBY, 1975; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Suas proteínas são importantes na invasão propriamente dita do parasito na célula hospedeira e também são secretadas no interior do vacúolo parasitóforo, onde ligam-se à membrana deste para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que a mitocôndria e o retículo endoplasmático são posicionados adjacentes a este vacúolo (HELMPHILL *et al.*, 2006). *T. gondii* exibe cerca de 30 proteínas típicas de roptrias, sendo algumas transmembranas e outras constituintes do ambiente interno. Algumas proteínas de roptrias são homólogas a quinases, fosfatases e proteases, revelando sua importância para as funções do parasito (FLEIGE; SOLDATIFRAVE, 2008). Proteínas como ROP5, ROP16 e ROP18 funcionam como proteínas quinases ou pseudoquinases que modulam ou auxiliam na modulação da resposta imune do hospedeiro, funcionando como um mecanismo de evasão do parasito (TAYLOR *et al.*, 2006; SAEIJ *et al.*, 2006; SAEIJ *et al.*, 2007; PEIXOTO *et al.*, 2010, REESE *et al.*, 2011; BURCHER *et al.*, 2011; BEHNKE *et al.*, 2011). As proteínas das roptrias também são importantes marcadores de virulência de *T. gondii* (BRADLEY; SIBLEY, 2007; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Grânulos densos também são organelas secretoras que descarregam seu conteúdo logo após a invasão e associa-se com a membrana do vacúolo parasitóforo. As proteínas de grânulos densos exibem função na aquisição de nutrientes da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2000; DENKERS; BUTCHER, 2005). Outra função destes grânulos densos é a liberação de glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, possibilitando ao parasito evadir das respostas da célula hospedeira, como a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; SOUZA *et al.*, 2010). Magno e colaboradores (2005) sugerem que a membrana do vacúolo parasitóforo sofre modificações no decorrer do processo de infecção para facilitar a sobrevivência e a proliferação do patógeno dentro da célula hospedeira, garantindo assim o curso da infecção.

Sabe-se que *T. gondii* é capaz de invadir e se multiplicar em qualquer célula nucleada. A invasão pode ocorrer de duas maneiras, por endocitose ou por penetração ativa (WERK, 1985; DOWSE; SOLDATI, 2004). As etapas de adesão e invasão na célula hospedeira são estratégias cruciais para *T. gondii* estabelecer a infecção. A penetração do parasito requer que seu pólo anterior (onde está o conóide) entre em contato com a superfície da célula hospedeira para desencadear a invaginação da membrana celular. A invasão ativa dura aproximadamente de 15 a 20 segundos e depende de interações de moléculas presentes na superfície do parasito como moléculas presentes na membrana da célula

hospedeira (CARRUTHERS; BOOTHROYS, 2007; SHARMA; CHITNIS, 2013; WALKER et al., 2014). O movimento do conóide está relacionado com a criação de um vacúolo parasitóforo, um ambiente intracelular adequado para o crescimento e desenvolvimento do parasito (CHIAPPINO et al., 1984). A formação e o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo envolvem o reconhecimento da célula hospedeira e a ativa invasão do parasito, com secreção de proteínas das micronemas e roptrias, levando à formação de um vacúolo não fusogênico (JONES; HIRSCH, 1972). Uma vez no interior da célula hospedeira e envolto por esse vacúolo inicia-se uma replicação em larga escala, culminando na ruptura da célula hospedeira e o processo se reinicia em células adjacentes (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

1.2. Ciclo biológico e mecanismos de transmissão

O ciclo biológico de *T. gondii* é considerado heteroxênico, sendo os hospedeiros definitivos animais dos gêneros *Felix* e *Lynx*, nos quais o parasito desenvolve um ciclo de vida sexuado, enquanto em hospedeiros intermediários, como aves e mamíferos incluindo a espécie humana, o parasito desenvolve o ciclo assexuado (SILVA; LANGONI, 2009).

Os estágios infectantes de *T. gondii* são taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (MONTROYA, LIENSENFELD, 2004). Taquizoítas apresentam forma de meia lua, possuem aproximadamente de 2 a 6 μm de diâmetro, com a região anterior afilada e a posterior recurvada, o núcleo frequentemente está situado junto à parte posterior ou na região central da célula (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). Esta forma evolutiva é encontrada no estágio agudo da infecção, na qual o parasito possui uma elevada capacidade de multiplicação intracelular, principalmente nos tecidos muscular, ocular, nervoso e placenta dos hospedeiros intermediários (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004). Bradizoítas são as formas típicas encontradas na fase crônica da infecção e se localizam dentro de cistos teciduais, os quais se formam em resposta ao sistema imune dos hospedeiros (MONTROYA, LIENSENFELD, 2004). Os cistos de bradizoítas exibem dimensões variáveis; os jovens podem medir 5 μm , com 4 bradizoítas em seu interior; os cistos mais velhos podem apresentar até 100 μm e conter centenas de bradizoítas em seu interior (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O cisto é a forma latente do parasito e está presente nas infecções congênitas e adquiridas, crônicas ou assintomáticas. Cistos teciduais contendo centenas ou milhares de bradizoítas podem se

desenvolver em órgãos como pulmão, fígado e rins, porém, são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares, como olhos, cérebro, músculo esquelético e cardíaco, podendo permanecer intactos durante a vida inteira do hospedeiro sem causar nenhum dano à saúde (DUBEY, 1988). A forma bradizoíta pode ser liberada dos cistos, transformando-se em taquizoíta novamente e causando a reagudização da infecção em indivíduos imunocomprometidos (MONTOYA, LIENSENFELD, 2004). Por outro lado, os esporozoítas localizam-se no interior de oocistos, são localizados somente nos hospedeiros definitivos e, ao serem liberados juntamente com as fezes dos felinos no meio ambiente, esporulam-se e tornam-se altamente resistentes e infectantes (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). O oocisto, em condições de umidade, temperatura e local sombreado, é capaz de se manter infectante por cerca de 12 a 18 meses no ambiente (KAWAZOE, 2002). Os oocistos são bem resistentes no meio ambiente, pois são formados de uma parede dupla composta de proteínas ricas em resíduos de cisteína e tirosina (POSSENTI *et al.*, 2010), o que lhes permite uma longa existência e, desta forma, aumenta as chances de infecção para dar continuidade ao ciclo biológico do parasito (DUMETRE *et al.*, 2013).

Felinos podem ser infectados com qualquer uma das fases evolutivas de *T. gondii*, no entanto, a sequência de eventos melhor conhecida é aquela que se desenvolve após a ingestão de cistos teciduais, na qual enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal dissolvem a parede desses cistos liberando centenas de bradizoítas que invadem as células epiteliais do intestino delgado. Neste local, o parasito se multiplica por um processo denominado esquizogonia dando origem aos esquizontes. Os núcleos dos esquizontes iniciam lentamente sua divisão da membrana plasmática originando merozoítos, estes por sua vez originam os gametas masculinos e femininos, que fertilizam-se no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo culminando na formação de oocistos. Juntamente com as fezes, os oocistos são eliminados para o ambiente onde sofrem esporulação resultando em oito esporozoítas no interior de cada oocisto (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). A partir do momento em que o hospedeiro intermediário ingere o oocisto ou cistos teciduais, os parasitos convertem para o estágio de taquizoítas, sendo capazes de invadir qualquer célula do organismo (MONTTOYA, LINSNFELD, 2004).

O principal método de infecção da espécie humana por *T. gondii* é a via oral, ou seja, pela ingestão de carnes cruas ou mal cozidas de ovinos, suínos e caprinos que contenham cistos teciduais e/ou pela ingestão de oocistos em alimentos e água contaminados por fezes de gatos infectados (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000,

ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Hábitos culturais e alimentares, bem como a precariedade no controle do saneamento básico estão ligados a essa rota de transmissão, além disso, é responsável pela maior taxa de infecção por *T. gondii*, levando a diferenças significativas na prevalência mundial do parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012). Taquizoítas ingeridos através de leite contaminado chegam ao estômago e são destruídos, entretanto, alguns parasitos penetram na mucosa oral e evoluemdo mesmo modo originando cistos e oocistos. Cada taquizoíta, esporozoíta ou bradizoíta, após rápida passagem pelo epitélio intestinal, sofre intensa multiplicação e penetra em vários tipos de célula do organismo, formando o vacúolo parasitóforo. Nestes vacúolos, os parasitos sofrem divisões sucessivas por endodiogenia, formando novos taquizoítas (fase proliferativa), que liberam proteínas tipo perforinas, causando poros na membrana e liberando novos taquizoítas, que invadirão novas células. Essa disseminação do parasito no organismo ocorre através de taquizoítas livres na linfa, no sangue circulante ou no interior de monócitos, que poderão provocar um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, cepas do parasito e da suscetibilidade do hospedeiro (AMATO; 2002).

Outro método de infecção é a transmissão vertical ou transplacentária que está associada à infecção ou reinfecção por diferentes cepas durante o curso gestacional (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; CARRUTHERS, 2002). De acordo com Carlier e colaboradores (2012), a expressão “transmissão vertical” inclui rotas de transmissão do parasito da mãe infectada para o feto antes, durante e após o parto, enquanto que a transmissão congênita se refere à transmissão de *T. gondii* de uma mulher que adquiriu a infecção durante a gestação. Esta via de transmissão merece maior atenção à saúde pública, uma vez que resulta na toxoplasmose congênita. Esta forma da doença é considerada mais grave por atingir fetos e neonatos podendo gerar problemas físicos, psicomotores e diversas sequelas (TREES; WILLIAMS, 2005). As vias de infecção para o feto são: **transplacentária** – quando a gestante adquire a toxoplasmose durante a gestação e, se apresentar a fase aguda da doença, poderá transmitir *T. gondii* ao feto, tendo provavelmente os taquizoítos como formas responsáveis; **rompimento de cistos no endométrio** – apesar de a gestante apresentar a doença na fase crônica, alguns cistos localizados no endométrio podem romper-se (distensão mecânica ou ação lítica das vilosidades coriônicas da placenta), liberando os bradizoítos que penetram no feto (KAWAZOE, 2005).

A infecção materna por *T. gondii* nos primeiros meses da gestação pode resultar em morte fetal ou aborto espontâneo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Cerca de 90% dos recém-nascidos infectados por *T. gondii* apresenta exame físico normal logo ao nascimento. Porém, quando submetidos à investigação clínica mais completa, em torno de 40% deles mostram alguma alteração como retinocoroidite, calcificações intracranianas e dilatação dos ventrículos cerebrais. Os 60% que não apresentam alterações à investigação diagnóstica são considerados como tendo infecção subclínica (COUVREUR *et al.* 1984; REMINGTON *et al.* 2006). Raramente, bebês infectados no final da gestação podem apresentar quadros graves de infecção generalizada (CNEUDE *et al.* 2003; REMINGTON *et al.* 2006). A penetração ativa do protozoário através das mucosas ocular ou orofaríngea e transplante de órgãos podem ser uma via de transmissão, ocasionando, a toxoplasmose clínica (FREYRE, 1989; DUBEY *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2009).

1.3. Cepas de *T. gondii* e a toxoplasmose

A definição de virulência de *T. gondii* é complexa pelo fato do parasito ser considerado comum e poder infectar uma grande variedade de hospedeiros, no qual a susceptibilidade à infecção e a doença aguda é extremamente variável (RACHINEL *et al.*, 2004).

As cepas de *T. gondii* isoladas em diferentes espécies animais, apesar de morfologicamente indistinguíveis, variam quanto a sua virulência e patogenicidade (DUBEY; FRENKEL, 1973). Estas são classificadas em dois principais tipos, as chamadas cepas clonais (clássicas) cujos genótipos já foram identificados e, as cepas consideradas recombinantes, cujos genótipos diferem das cepas clonais (VILLENNA *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2012).

Adotando-se métodos de caracterização molecular, evidenciou-se a existência de linhagens bem definidas chamadas clonais, designadas como tipos I, II e III (DARDÉ; BOUTEILLE; PRESTE-ALEXANDRE, 1988; HOWE; SIBLEY 1995; DARDÉ, 1996). A patogenia dessas cepas foi determinada em camundongos sendo que as cepas de tipo I (RH, CAST e VEL) são consideradas de alta virulência, pois causam infecções letais nesses animais. As cepas de tipo II (ME49, PDS e 18 PLK) são consideradas de moderada virulência e as cepas do tipo III (CEP e VEG) são ditas de baixa virulência, já que a infecção causada por estes dois últimos tipos clonais é controlada pelo sistema imunológico dos camundongos e a infecção tende a cronificar (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; SAEIJ *et al.*, 2005; STUTZ *et al.*, 2012). As cepas do tipo II estão associadas a 81%

dos indivíduos com toxoplasmose, enquanto as cepas do tipo I e III foram encontradas em apenas 10% e 9% dos isolados de seres humanos, respectivamente (HOWE *et al.*, 1997).

Cepas do tipo I de *T. gondii*, como a RH, são capazes de induzir fosforilação prolongada dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6 via ROP16 e essa fosforilação atua diminuindo a indução da produção de interleucina (IL)-12. Já as cepas do tipo II do parasito, como a ME49, não são capazes de manter a fosforilação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6, resultando em alta produção de IL-12 após a infecção. Essas alterações no perfil de secreção de citocinas induzidas pelas diferentes cepas de *T. gondii*, podem estar associadas às estratégias que o parasito desenvolve para subverter mecanismos antiparasitários da célula hospedeira (HUNTER; SIBLEY, 2012).

A cepa RH, quando injetada em camundongos alogênicos (SWISS) ou isogênicos (BALB/c e C57BL/6), leva-os à morte e por isso é considerada como sendo virulenta ou altamente virulenta. Uma dose de 10^5 taquizoítas desta cepa seria suficiente para matar em 6-7 dias camundongos BALB/c (FUJII *et al.*, 1983). A cepa ME49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro, é uma cepa cistogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência (LUNDE; JACOBS, 1983). Em camundongos BALB/c, a cepa ME49 de *T. gondii* produz cistos que são, particularmente, evidentes no cérebro. O aparecimento de cistos caracteriza a fase crônica da infecção que persiste por toda a vida destes camundongos. Por outro lado, camundongos C57BL/6 infectados com a mesma cepa desenvolvem uma meningoencefalite progressiva com elevada taxa de mortalidade após 12 semanas de infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1993a).

Estudos prévios mostraram que células BeWo infectadas com a cepa RH apresentaram menor índice de apoptose do que as células não infectadas. Por outro lado, células BeWo infectadas pela cepa ME49 apresentaram maiores índices de apoptose do que as células infectadas pela cepa RH ou não infectadas (ANGELONI *et al.*, 2009). Assim, essas cepas de *T. gondii* regulam diferentemente apoptose no trofoblasto humano com um propósito possível de favorecer a infecção na célula hospedeira.

1.4. *Calomys callosus*

Calomys callosus é um roedor da família Cricetidae com ampla distribuição no território brasileiro e etologia bastante estudada (MELLO, 1984). São comumente encontrados em moradias humanas e seus anexos, especialmente, em regiões rurais. Possui importância epidemiológica por ser reservatório natural de *Trypanosomacruzi* (SANTOS *et al.*, 2008).

Esses animais também são susceptíveis às doenças infecciosas e parasitárias como leishmaniose, doença de Chagas (MELLO; TEIXEIRA, 1984; SANTOS *et al.*, 2008; TANIWAKI *et al.*, 2011) e toxoplasmose (FERRO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2011), o que proporciona excelente modelo biológico para o estudo de tais doenças.

Estudos utilizando o roedor *Calomys callosus* mostraram que estes animais apresentam elevada susceptibilidade à cepa RH de *T. gondii* (FAVORETO-JUNIOR *et al.*, 1998). Por outro lado, Pereira e colaboradores (1999) mostraram que *C. callosus*, são menos susceptíveis à cepa ME49, inoculados oralmente com 20 cistos teciduais, permitindo assim estudos sobre a transmissão vertical da toxoplasmose nestes.

Estudos anteriores mostraram que o período de aquisição de resistência materna de *C. callosus* à transmissão vertical do parasito ocorre com, aproximadamente, 60 dias (BARBOSA *et al.*, 2008) e que fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME49 e reinfectadas pela mesma cepa não são capazes de transmitir verticalmente o parasito (FERRO *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas pela cepa ME49 e desafiadas com a cepa RH também foram capazes de impedir a transmissão vertical do parasito, sugerindo que a infecção primária pela cepa ME49 conferiu proteção ao feto. Além disso, este estudo demonstrou que o desafio com a cepa RH não causou a morte desses animais (FRANCO *et al.*, 2011).

Atualmente, várias cepas atípicas ou recombinantes já foram identificadas, de modo que muitos casos graves de toxoplasmose congênita no Brasil foram notificados devido à presença destas cepas recombinantes no país (DUBEY *et al.*, 2012). Estudos prévios do nosso grupo descreveram o comportamento de dois isolados brasileiros de *T. gondii*, denominados TgChUD1 e TgChUD2. Estas cepas recombinantes promovem infectividade diferente em roedores *Calomys callosus*, sendo a TgChUD2 considerada mais virulenta pela acelerada morte causada nos animais (FRANCO *et al.*, 2014).

1.5. Resposta imune a *T. gondii*

A resposta imune contra *T. gondii* é complexa e envolve diversos tipos celulares e mecanismos efetores. Frente a todos esses mecanismos efetores, o parasito sofre modificações biológicas importantes, passando a uma forma de resistência nos tecidos, onde permanece dependendo da cepa e do hospedeiro (BELLANTI *et al.*, 1999).

A resposta imunológica limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradica definitivamente os cistos já existentes encontrados em

múltiplos órgãos. Estes cistos ocasionalmente se rompem liberando os bradizoítas, que podem evoluir para o estágio de taquizoítas e reinfectar células vizinhas, culminando em reações inflamatórias, mas com rápido controle pelo sistema imune. Caso o hospedeiro esteja com a resposta imune comprometida, o bloqueio imune dessa proliferação pode não ser eficiente e o parasito se disseminar rapidamente gerando quadros graves como a encefalite toxoplásmica em indivíduos imunocomprometidos como aqueles HIV positivos (KAWAZO, 2002).

Sendo *T. gondii* um parasito intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células com a participação de linfócitos T, macrófagos e células *Natural Killer* (NK) é considerada a mais relevante no mecanismo de controle da infecção (SHER *et al.*, 1993; GAZZINELLI *et al.*, 1993). A primeira linha de defesa contra o parasito durante a fase inicial da infecção é feita por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK (SHER *et al.*, 1993, GAZZINELLI *et al.*, 1993). Também ocorre a participação de receptores *Toll-like* (TLR), especialmente, TLR-2 (MUN *et al.*, 2003). TLRs são importantes durante a resposta imune inata, já que a interação do parasito com esses receptores presentes em células dendríticas, macrófagos e células NK desencadeia aumento na produção de IL-12 e interferon (IFN)- γ (MILLER *et al.*, 2009; YAROVISNKY, 2011; SANECKA; FRICKEL, 2012). A sinalização através destes receptores é complexa e envolve o recrutamento de moléculas como MYD88 (*Myeloid differentiation primary-response gene 88*). Estudos mostraram que a eficiência da resposta tipo Th1 via receptores *toll-like* durante infecção por *T.gondii* é dependente de MYD88. A ativação de MYD88 direciona à produção de fator de necrose tumoral (TNF)- α e à maior expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) classe II dos macrófagos (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2009). Receptor TLR11 em camundongos está envolvido diretamente no reconhecimento da profilina, uma molécula específica de *T. gondii* (SCANGA *et al.*, 2002; YAROVINSKY *et al.*, 2005).

Além de TLRs, os sensores proteicos NLRs (“*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing proteins*”) também participam da resposta imune inata contra *T. gondii*. Estes sensores são capazes de reconhecer o parasito e seus produtos excretados ou secretados no hospedeiro, direcionando a ativação dos inflamassomos, que correspondem a complexos multiproteicos que recrutam e ativam as caspases 1 e 11 (SONG; LE, 2012). Caspase 1 é uma enzima que induz à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18, ambas importantes para o início da produção de IFN- γ , principal citocina envolvida na resposta imune adaptativa contra *T. gondii*

(DINERELLO *et al.*, 1998). Trabalhos recentes demonstraram que os sensores proteicos NLRP1 e NLRP3 foram fundamentais no controle da infecção por *T. gondii* (EWALD; CHAVARRIA-SMITH; BOOTHROYD, 2014; GORFU *et al.*, 2014). Camundongos deficientes para NLRP3 e NLRP1 reduziram significativamente a produção de IL-18 e, ao mesmo tempo, a proliferação de *T. gondii* aumentou provocando uma maior mortalidade dos animais, comprovando a importância destes mediadores na resposta imune celular contra o parasito (GORFU *et al.*, 2014).

Macrófagos e células dendríticas produzem IL-12, que estimula células NK e ativa os linfócitos TCD4⁺ que, por sua vez, diferenciam-se na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que representa a principal citocina envolvida na resposta imune a *T. gondii*. A produção de IFN- γ por células NK também é aumentada por IL-12, sendo essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 (KENNEDY *et al.*, 1994). O papel da IL-12 foi estudado também em modelos murinos imunocompetentes e imunossuprimidos, comparativamente, e observou-se que a administração dessa citocina a estes grupos infectados por *T. gondii* aumenta a sobrevivência de ambos de maneira significativa. Entretanto, tal proteção é anulada quando os camundongos sofrem depleção de IFN- γ , TNF- α ou células NK. A neutralização de IL-12 resulta em 100% de mortalidade em camundongos infectados (GAZZINELLI *et al.*, 1994; HUNTER *et al.*, 1995), inclusive com a cepa ME49, sugerindo que o parasito induz a produção de IL-12 como mecanismo de proteção para hospedeiro, garantindo desta forma a sobrevivência do mesmo (HUNTER *et al.*, 1995).

IL-2 é uma citocina que promove a proliferação e expansão clonal dos linfócitos no local da infecção. IFN γ é a principal citocina envolvida no controle da infecção por *T. gondii* (SUZUKI *et al.*, 1988), levando a ativação de células efetoras para controlar a replicação intracelular do parasito, ou eventualmente causando sua destruição (YAP, SHER, 1999). Esta citocina apresenta também um papel importante tanto na imunidade adquirida em infecções agudas como no controle do crescimento do parasito em animais cronicamente infectados (SUZUKI; CONLEY; REMINGTON *et al.*, 1989; GAZZINELLI *et al.*, 1991, 1996). De acordo com Melo e colaboradores (2011) a ligação de IFN- γ ao seu receptor induz a fosforilação de STAT1, que induz a expressão de vários genes envolvidos com a indução da eliminação de *T. gondii*. Além disso, IFN- γ está associado com a indução da conversão de taquizoítas em bradizoítas, induzindo a cronificação da infecção e, também, está associado com a prevenção da ruptura dos cistos teciduais impedindo a reagudização da infecção (MILLER *et al.*, 2011). Buzoni-Gaetel e

colaboradores (2001) observaram uma superprodução de IFN- γ e síntese de óxido nítrico após infecção oral por *T. gondii* em modelos murinos. Na interface materno-fetal, o papel funcional de IFN- γ é intrigante. Quando camundongos infectados por *T. gondii* recebem IFN- γ se observa uma proteção significativa exercida por esta citocina (MCCABE *et al.*, 1984; SUZUKI *et al.* 1988); entretanto, quando se neutraliza IFN- γ em camundongos Balb/c em fase aguda da toxoplasmose, observa-se uma diminuição na infecção placentária e fetal de tais animais (ABOU-BACAR *et al.*, 2004). Células trofoblásticas humanas BeWo são incapazes de controlar a infecção por *T. gondii*, mesmo quando tratadas com IFN- γ (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2015).

Outra via microbicida dependente de IFN- γ é a indução da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Esta enzima degrada o triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento de *T. gondii* em uma variedade de células como fibroblastos fetais e células endoteliais (PFEFFERKORN, 1984, NAGINENI *et al.*, 1996, DAUBENER, MACKENZIE, 1999, ENGIN *et al.*, 2012). Gavrilescu e Denkers (2001; 2003) sugeriram que infecções com cepas de *T. gondii* altamente virulentas resultam em alta produção de IFN- γ e altos níveis de apoptose, em contraste com cepas de baixa virulência. Sendo assim, camundongos infectados com taquizoítas da cepa tipo I (RH) apresentam níveis aumentados de morte celular por apoptose no baço imediatamente antes da morte. No entanto, este fato não parece ser diretamente atribuído a destruição de tecidos induzida pelo parasito, mas é causada por altos níveis de mediadores pró-inflamatórios induzidos pela cepa RH. Camundongos que não expressam IFN- γ não sobrevivem à fase aguda da infecção, enquanto que a neutralização dessa citocina, mediada por anticorpos, durante a infecção crônica por *T. gondii*, demonstra que a produção continuada de IFN- γ e a presença de óxido nítrico são necessárias para a sobrevivência do hospedeiro. (DENKERS *et al.*, 2004). Portanto, IFN- γ e outras citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 têm efeito sinérgico na indução de uma resposta imunológica adequada contra *T. gondii* (SIBLEY *et al.*, 1991).

Os linfócitos T são divididos nas subpopulações Th1 e Th2, distinguidas pelo padrão seletivo de produção de citocinas. Células Th1 secretam IFN- γ , TNF- α , TNF- β e IL-2 que ativam reações mediadas por células. Células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecem a produção de anticorpos e regulam a resposta imune (CHERWINSKI *et al.*, 1987). A citocina IL-12 estimula a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ para o perfil Th1 (TRINCHIERI, 1993). Células Th1 e Th2 são mutuamente

inibitórias, ou seja, IL-10, um produto das células Th2, inibe o desenvolvimento das células Th1 (VILCEK, 1994). IFN- γ é um potente inibidor da diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linfócitos Th2 (GAJEWSKI; FITCH, 1988). Dessa forma, *T. gondii*, ao estimular os macrófagos e células NK a produzirem IFN- γ , induzem respostas dominadas pelos linfócitos Th1 tendendo, portanto, para uma imunidade predominantemente do tipo Th1. Ao contrário, as citocinas IL-4 e IL-10 estimulam a diferenciação em direção aos linfócitos Th2 e, portanto, para a imunidade predominantemente do tipo Th2 (MOSMANN, 1991). A indução de IL-10 pode ser uma importante estratégia pela qual o parasito se evade da resposta imune celular dependente de IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Estudos prévios mostraram o papel benéfico de IL-10 favorecendo infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas BeWo (BARBOSA *et al.*, 2008).

Linfócitos TCD8⁺ também desempenham uma função efetora importante contra o parasito. Células TCD8⁺ efetoras são citotóxicas, lisam as células infectadas e expõem os parasitos, antes protegidos no interior de vacúolos parasitóforos, contribuindo na proteção contra a formação de cistos teciduais. Para a geração destas células TCD8⁺ efetoras é requerida a participação das células TCD4⁺ (GAZZINELLI *et al.*, 1993). Dessa reação específica, formam-se células de memórias, tanto para células TCD4⁺, quanto para as células TCD8⁺.

Nossos estudos prévios mostraram o papel protetor importante de IL-6 contra a infecção por *T. gondii* em monócitos humanos da linhagem THP-1 (CASTRO *et al.*, 2013) e em células trofoblásticas humanas (BARBOSA *et al.*, 2015). Em adição, o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é outra citocina envolvida na resposta imune contra *T. gondii*, uma vez que camundongos MIF nocautes foram mais susceptíveis à infecção pelo parasito (FLORES *et al.*, 2008) e esta citocina mostrou-se capaz de controlar a proliferação de *T. gondii* em vilos placentários humanos (GOMES *et al.*, 2011) e também em células trofoblásticas humanas (FRANCO *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2014). No entanto, o papel de MIF em controlar a infecção por *T. gondii* parece estar limitado à produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) no trofoblasto humano (BARBOSA *et al.*, 2014). Baixas doses de MIF no trofoblasto humano induziu significativa fosforilação de quinases ativadas por sinal extracelular (ERK1/2) e alta produção de PGE₂, o que prejudicou o controle da infecção nessas células (BARBOSA *et al.*, 2014). Entretanto, altas doses de MIF no trofoblasto humano reduzem PGE₂ e favorecem o controle do parasitismo no trofoblasto humano (BARBOSA *et al.*, 2014). Portanto, é possível concluir que mediadores lipídicos, como a PGE₂, estão envolvidos na maior

susceptibilidade a infecção por *T. gondii*, conseqüentemente, enzimas envolvidas na produção deste mediador, como as ciclooxigenases (COX), possivelmente também estão envolvidas. Neste sentido, estudos que possam esclarecer o papel destas COXs durante a resposta imune a *T. gondii* são importantes para melhor entender a resposta contra essa parasitose, o que pode ajudar no desenvolvimento de futuras terapias.

1.6. Ciclooxigenase e mediadores lipídicos

A permanência de *T. gondii* em células hospedeiras envolve uma série de eventos moleculares e estruturais de ambas as células (ALEXANDER *et al.*, 2005). Além de características singulares, o vacúolo parasitóforo que abriga *T. gondii* estabelece interações com organelas da célula hospedeira que podem estar relacionadas com as vias de aquisição de nutrientes pelo parasito (SINAI, 2008). Corpos lipídicos são organelas ricas em lipídios, altamente reguladas e presentes em vários tipos de células eucarióticas: plantas, algas, protozoários, leveduras e células animais (ZWEYTICK *et al.*, 2000). Estruturalmente, os corpos lipídicos consistem de um núcleo de lipídios apolares (ésteres de colesterol e triglicerídeos) envoltos por uma monocamada única de fosfolipídios. Contem lipídios neutros, triacilgliceróis (TG), proteínas quinases, caveolinas, citocinas, variada composição proteica, ésteres de esterol e enzimas formadoras de eicosanóides (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; ACCIOLY *et al.*, 2008).

Os corpos lipídicos são vistos como organelas metabolicamente ativas participando de uma série de funções tais como homeostase de lipídios, sinalização celular, tráfico de vesículas intracelulares, patogênese de doenças (diabetes e obesidade) e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (ZEHMER *et al.*, 2009). São também descritos como “estoques” de ácido araquidônico (AA) precursores de eicosanóides, vistos em leucócitos e em diferentes subgrupos, incluindo eosinófilos, neutrófilos e monócitos, que contém enzimas formadoras de eicosanóides, como por exemplo as COXs, especificamente COX-1 e COX-2. Estudos mostram o acúmulo de corpos lipídicos em leucócitos em condições inflamatórias como, por exemplo, sepse bacteriana, inflamação pulmonar alérgica, artrite e em infecções micobacterianas. A conversão enzimática de AA livre pela enzima COX-2 resulta em produção de PGE₂ que, por sua vez, estabelece uma modulação na resposta celular, o que ocasiona aumento da carga parasitária por *T. gondii* (BOZZA *et al.*, 2009).

PGE₂ é um mediador lipídico importante para respostas inflamatórias e imunológicas durante infecções nas fases aguda e crônica. Este mediador lipídico tem a

capacidade de regular a ativação, maturação, migração e secreção de citocinas de várias células do sistema imunológico, em particular aquelas que estão envolvidas na imunidade inata como macrófagos, neutrófilos, células NK e células dendríticas (NAGAMATSU; SCHUST, 2010).

Assim, as células imunes são a principal fonte de produção de PGE₂ durante uma resposta inflamatória (KALINSKI, 2012). No interior destas células, a PGE₂ é derivada da liberação de ácido araquidônico (AA) proveniente de estoques celulares de fosfolipídios, incluindo aqueles da membrana plasmática, sendo esta liberação dependente da enzima fosfolipase A₂ (PAWLOWSKI *et al.*, 1983). A conversão de ácido araquidônico em PGE₂ se dá pela enzima COX, que existe em duas isoformas: COX-1 que é considerada constitutiva, é expressa na maioria dos tecidos constantemente e é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal dos tecidos. A segunda isoforma é a COX-2 considerada induzida, uma vez que o aumento da sua expressão está relacionado geralmente a estímulos por endotoxinas como LPS (produzidos por bactérias), citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos e linfócitos, lesões celulares sejam elas químicas ou físicas (BATLOUNI, 2010). Interessantemente, o aumento da expressão de COX-2 também pode ser estimulado por estresse psicológico (GARCIA-BUENO; LEZA, 2008).

Os mecanismos de sinalização envolvidos na regulação positiva de COX-2 ainda não são bem compreendidos. A inibição da expressão de COX-2 ou a sua atividade é um componente chave de tratamentos para doenças inflamatórias e de crescimento tumoral (TSATSANIS *et al.*, 2006).

As prostaglandinas possuem quatro receptores conhecidos como EP1, EP2, EP3, EP4 e, pelo menos, três variantes de EP3 são reconhecidos como: EP3 α , EP3 β e EP3 γ . Esta diversidade de receptores de PGE₂ influencia nas funções pró-inflamatórias e imunossupressoras desta molécula. EP3 e EP4 são considerados receptores de alta afinidade. Por outro lado, EP1 e EP2 exigem maiores concentrações de PGE₂. Além disso, os quatro receptores de PGE₂ variam nas durações do sinal intracelular (SUGIMOTO *et al.*, 1992; HATA; BREYER, 2004). Enquanto os receptores de PGE₂ têm diferenças fundamentais na afinidade, há semelhanças entre alguns desses receptores. Por exemplo, EP2 e EP4 são receptores acoplados a proteínas G, que sinalizam principalmente através da adenilato ciclase dependente de cAMP e vias de PKA/CREB. EP2 e EP4 são os receptores responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores de PGE₂ (FUJINO *et al.*, 2005). A diversidade de receptores, vias de sinalização e sinal de duração

permite que a PGE₂ atue em diferentes tipos de células em resposta a estímulos ambientais (STEFANELLI *et al.*; 2012).

Neutrófilos são os primeiros a serem recrutados para os locais da infecção durante uma resposta imune inata. Estas células possuem diversos mecanismos de defesa imunológica, incluindo fagocitose, liberação de enzimas proteolíticas e mediadores inflamatórios. Por conseguinte, a migração adequada, bem como a sinalização entre esses granulócitos e outras células do sistema imunológico é importante para permitir uma resposta imune eficaz nas fases iniciais da infecção. Segundo Talpain e colaboradores (1995), após tratamento exógeno, PGE₂ inibiu a ativação e agregação de neutrófilos humanos. Também, macrófagos são células importantes para a resposta imune e PGE₂ é capaz de atrair localmente tais células na fase inicial da inflamação (NAKAYAMA *et al.*, 2006). A ativação dos macrófagos pode ser inibida por meio da sinalização de PGE₂ via EP2 (ZASLONA *et al.*, 2012). Em adição, PGE₂ suprime a atividade de macrófagos através da inibição da produção de NO (MAROTTA *et al.*; 1992; ASAKRAH *et al.*; 2013).

Células NK são importantes durante a resposta imune inata, pois respondem a alterações no perfil de citocinas durante a infecção, a fim de lisar células infectadas. PGE₂ tem um efeito negativo sobre essa atividade citolítica, pois suprime a capacidade de resposta pelas citocinas IL-12 e IL-15 (BANKHURST, 1982; WALKER; REDONDO, 2004). As células NK também secretam IFN- γ como mecanismo de sinalização para ativar macrófagos durante a resposta imune inata e auxiliar as células dendríticas em dirigir respostas Th1. PGE₂ suprime a ativação das células NK mediada por macrófagos por meio da inibição da produção de IFN- γ (MAILLIARD *et al.*, 2005).

As células dendríticas apresentam antígeno para células do sistema imunológico durante a resposta imune inata, iniciam uma resposta adaptativa e são importantes na mudança entre as respostas imune Th1 e Th2. PGE₂ pode prejudicar a diferenciação de células dendríticas nos estágios iniciais de desenvolvimento e nas fases posteriores (KALINSKI *et al.*, 1998).

Portanto, PGE₂ e COX-2 são importantes em respostas inflamatórias ativadas por processos de origem infecciosa ou não, no entanto parecem exercer uma função imunomodulatória que busca prevenir uma exacerbada reação inflamatória que, muitas vezes, pode favorecer a disseminação de microorganismos patogênicos pelo organismo hospedeiro.

1.7. Ciclooxygenase, PGE₂ e infecções causadas por patógenos

Bactérias gram-positivas e gram-negativas induzem a produção de PGE₂. Os níveis de PGE₂ são significativamente regulados no pulmão e no trato gastrointestinal para manter a integridade da barreira da mucosa, além disso, já foi demonstrado que bactérias podem modular a biossíntese de PGE₂, que levaria à colonização do pulmão e do intestino (HARRIS *et al.*, 2002; HESSLE *et al.*, 2003; TAKEUCHI *et al.*, 2010; BOZYK; MOORE, 2011). Apesar das funções de PGE₂ estarem mais bem elucidadas durante infecções bacterianas, a produção e o papel funcional deste mediador lipídico durante infecções por protozoários ainda são poucos compreendidos.

Dentre as várias moléculas efetoras relacionadas à patogênese e resposta imune durante infecção causada por *Plasmodium* sp, a COX-2 se destaca. O nível de expressão desta enzima está inversamente associado com a gravidade da doença quando consideramos a malária cerebral (PERKINS *et al.*, 2005). Portanto, estudos sugerem que o aumento da produção de PGE₂ está associado com efeitos protetores e que a redução nos níveis de PGE₂ pode promover o aumento da patogênese (PERKINS *et al.*, 2005). Em adição, estudos demonstraram um aumento significativo de PGE₂ durante infecções causadas por *Cryptosporidium parvum* (ARGENZIO; RHOADS, 1997), *T. gondii* (YONG *et al.*, 1994), *Leishmania donovani* (REINER, MALEMUD, 1985), *L. major* (CILLARI *et al.*, 1986) e *Trypanosoma cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

Foi demonstrado que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com infecção crônica por *T. cruzi* produziram elevadas concentrações de PGE₂ que, por sua vez, modulou negativamente a resposta inflamatória e diminuiu a proliferação celular (GOMES *et al.*, 2013). Além do mais, prostaglandinas exibiram função imunossupressora ao reduzir a produção de IL-2 durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (MICHELIN *et al.*, 2005). De acordo com Michelin e colaboradores (2005), esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* produziram grandes quantidades de PGE₂. Além disso, o tratamento com inibidores preferenciais de COX-2, Meloxicam ou Etoricoxibe, reduziu significativamente a produção de PGE₂ em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *T. cruzi*, sugerindo assim que a COX-2 é a principal isoforma envolvida na liberação de PGE₂ durante a infecção por este parasito (MICHELIN *et al.*, 2005). Em adição, este mesmo tratamento com inibidores de COX-2 controlou a parasitemia e reduziu o foco inflamatório no tecido cardíaco dos animais infectados por *T. cruzi* (ADBALLA *et al.*, 2008). Finalmente, altos níveis de PGE₂ em camundongos infectados com *T. cruzi*

estiveram envolvidos com o aumento da carga parasitária e inibição de citocinas IL-6 e TNF- α em tecidos cardíacos destes animais (ABDALLA *et al.*, 2008).

Em contrapartida, Celentano e colaboradores (1995) observaram que o tratamento com inibidores da ciclooxigenase (aspirina ou indometacina) aumentou a taxa de mortalidade de camundongos C3H/HEN infectados com a cepa K98 de *T. cruzi*, evidenciando um papel protetor de ciclooxigenases na resposta imune a este parasito. Portanto, ainda existem dados discrepantes com relação ao papel de COX-2 e PGE₂ durante infecções causadas por *T. cruzi*.

De acordo com Tegeder e colaboradores (2001), inibidores de COX-2 podem atuar diretamente na modulação da expressão de citocinas por meio da inibição de fatores de transcrição como AP-1 e proteínas de sinalização da família das enzimas ativadas por mitógenos (MAPKs), como as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK)1/2. Freire-de-Lima e colaboradores (2000) observaram que PGE₂ induziu à diferenciação de células Th0 para perfil Th2. Por outro lado, a inibição de COX-2 e, conseqüentemente de PGE₂, poderia restabelecer a expressão de citocinas Th1, como IL-2 e IFN- γ , bem como a síntese de NO.

Estudos recentes demonstraram que PGE₂ reduziu a liberação de IL-17 e a expressão do fator regulador de interferon (IRF) -4 em células T de camundongos infectadas por *Cryptococcus neoformans*, favorecendo a persistência da infecção (VALDEZ *et al.*; 2012). A proliferação de *Leishmania* em macrófagos murinos foi favorecida pela alta expressão de COX-2 e PGE₂, uma vez que, quando COX-2 foi bloqueada, a proliferação de *Leishmania* foi reduzida significativamente (BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2006).

Portanto, alguns papéis de COX-2 e PGE₂ já estão sendo elucidados durante infecções causadas por protozoários parasitas, mas muito pouco se sabe em relação a infecção causada por *T. gondii*. Já foi demonstrado que corpos lipídicos associam-se ao vacúolo parasitóforo de *T. gondii* em macrófagos peritoneais de camundongos infectados e isto induziu a uma atividade microbicida deficiente pelo aumento de PGE₂ e diminuição de NO, evidenciando que PGE₂ favoreceu a proliferação intracelular de *T. gondii* nestas células (MOTA *et al.*, 2014). Outro estudo recentemente publicado também demonstrou a associação do vacúolo parasitóforo de *T. gondii* com corpos lipídicos em células musculares esqueléticas murinas, e este fenômeno esteve relacionado ao aumento de PGE₂ nestas células estabelecendo condições favoráveis para a disseminação de *T. gondii*

(GOMES *et al.*, 2014). *T. gondii* também induziu a expressão de COX-2/PGE₂ e secreção de quimiocinas (MCP-1) em células HeLa infectadas por meio da via de sinalização de MAPKs. A ativação de MAPKs, como ERK1/2 e p38, esteve envolvida na invasão e proliferação de taquizoítas de *T. gondii* nestas células hospedeiras e esta condição esteve diretamente associada com a expressão de COX-2 e PGE₂ (KIM *et al.*; 2006).

Estudos recentes de nosso grupo demonstram que ERK1/2 e PGE₂ participaram dos mecanismos de replicação de *T. gondii* em células BeWo (BARBOSA *et al.*, 2014). Células BeWo estimuladas com baixas concentrações de MIF mostraram forte fosforilação de ERK1/2 e significativa produção de PGE₂, o que coincidiu com uma maior proliferação intracelular de *T. gondii* e a uma redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6. Por outro lado, altas concentrações de MIF em células BeWo não fosforilaram ERK1/2 e não contribuíram para a liberação de PGE₂, controlando a carga parasitária e, por conseguinte, mostrando a importância deste mediador lipídico durante infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (BARBOSA *et al.*; 2014).

Os dados aqui apresentados reforçam a importância de compreender o real papel de PGE₂ e COX-2 durante a infecção por *T. gondii in vivo*, visto que todos os trabalhos já publicados a respeito de *T. gondii* e COX-2/PGE₂ foram desenvolvidos com modelos *in vitro* e muitos aspectos desta relação *T. gondii*/COX-2/PGE₂ ainda precisam ser esclarecidos.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que um terço da população mundial está infectada por *T. gondii* e que esta infecção pode causar manifestações clínicas graves em indivíduos imunocomprometidos e durante a infecção congênita, estudos devem ser realizados com a finalidade de melhor compreender a resposta inflamatória desencadeada por *T. gondii* *in vivo*. Em adição, alguns estudos prévios começaram a mostrar o papel importante de mediadores lipídicos e COX-2 durante infecção por *T. gondii* em vários modelos *in vitro*. Assim, o presente trabalho justifica-se por buscar esclarecer o verdadeiro papel dos mediadores inflamatórios COX-2 e PGE₂ durante infecção por *T. gondii* *in vivo*. Além disso, o presente trabalho também comparou o papel destes mediadores (COX-2 e PGE₂) durante infecção por cepas diferentes de *T. gondii*, usando uma cepa altamente virulenta (RH) e uma moderadamente virulenta (ME49). Para executar estas propostas, *Calomys callosus*, um roedor da família Cricetidae muito encontrado no cerrado brasileiro, foi usado como modelo experimental, desde que a infecção por *T. gondii* nestes animais é muito semelhante à espécie humana como já verificado por trabalhos prévios de nosso grupo (FERRO *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel funcional de ciclooxygenases, especialmente COX-2, durante infecção por *T. gondii* causada por cepas virulenta (RH) *in vitro* e moderadamente virulenta (ME49) em modelo experimental *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a alteração de peso corporal e índices de morbidade em roedores *C. callosus* infectados por *T. gondii* (cepa ME49) e tratados ou não com inibidores de ciclooxygenase.
- Quantificar a carga parasitária em cérebro de *C. callosus* infectados por *T. gondii* (cepa ME49) e tratados ou não com inibidores de ciclooxygenase.
- Verificar a produção de citocinas (TNF- α , MIF, IL-1 β e IFN- γ) no soro de *C. callosus* infectados por *T. gondii* (cepa ME49) e tratados ou não com inibidores de ciclooxygenase.
- Avaliar o efeito de inibidores de ciclooxygenase na proliferação de *T. gondii* (cepa RH) em macrófagos peritoneais de *C. callosus*.
- Avaliar o efeito de inibidores de ciclooxygenase na produção de citocinas (IL-6, MIF, TNF- α e IL-1 β) e nitrito em macrófagos peritoneais de *C. callosus* infectados por *T. gondii* (cepa RH).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais de experimentação

C. callosus (linhagem Canabrava) foram mantidos em Biotério pertencente ao Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os roedores foram mantidos com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, sob condições livres de patógenos e com dieta *ad libitum* composta de ração apropriada e água filtrada. Todos os procedimentos experimentais usando estes animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia. O CEUA aprovou o presente projeto de pesquisa (CEUA/UFU 144/13).

4.2. Manutenção das cepas de *T. gondii*: ME49 e RH

Para experimentos com a cepa ME49 (moderadamente virulenta), a mesma foi mantida na forma de cistos teciduais contendo bradizoítas no seu interior em encéfalos de *C. callosus* machos de acordo com Barbosa e colaboradores (2007). Brevemente, *C. callosus* machos previamente infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* foram anestesiados com solução de xilazina 2% (Syntec, Hortolândia, SP, Brasil) e cetamina 10% (Syntec) e eutanasiados por deslocamento cervical. Os encéfalos dos animais foram removidos assepticamente, lavados, macerados e homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril (pH 7.0) por aspiração usando seringa de 5ml e agulha de 25x7mm. Aliquotas de 20µl da solução obtida foram observadas em microscópio de luz (objetiva 10x) para contagem de cistos teciduais contendo bradizoítas no interior. Após contagem dos cistos, ajustou-se um volume de 100µl de PBS estéril contendo 20 cistos teciduais para inóculo via oral de novos machos de *C. callosus* com a finalidade de manutenção da cepa. Foi utilizado um total de 15 machos para manutenção da cepa ME49 de *T. gondii*. Paralelamente, o mesmo volume de PBS estéril contendo 50 cistos teciduais foi utilizado para inóculo via oral das fêmeas do grupo experimental, como será descrito em detalhes na seção posterior. O inóculo via oral foi realizado usando seringa adaptada com cânula intragástrica para garantir a infecção adequada dos animais (BARBOSA et al., 2007).

Para experimentos com a cepa RH linhagem 2F1 (altamente virulenta), taquizoítas desta cepa foram mantidos em frascos de cultura contendo células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) no intuito de obter parasitos “*in vitro*” para os procedimentos

experimentais. Células BeWo infectadas foram mantidas em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo, SP, Brasil) suplementado com 2% de soro bovino fetal (Cultilab), 100U/mL de penicilina (SigmaChemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (ANGELONI et al., 2009). À medida que a maioria das células infectadas por RH em cultura encontraram-se lisadas pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi passado para um tubo de 15ml, centrifugado a 400 x g por cinco minutos em temperatura ambiente e o “pellet” ressuspenso em 1ml de meio RPMI e distribuído em novos frascos contendo células não infectadas.

4.3. Grupos experimentais: tratamento com inibidores de ciclooxigenase

Vinte fêmeas de *C. callosus*, entre 2 e 3 meses de idade e com massa corporal em torno de 40g, foram usadas para realização dos procedimentos experimentais.

As fêmeas foram infectadas oralmente com 50 cistos da cepa ME49. Posteriormente, estas fêmeas foram divididas em 4 subgrupos (I, Ia, II e IIa) contendo 5 fêmeas em cada. O subgrupo I foi tratado com inibidor de COX-1/COX-2, Meloxicam (Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil), a 0,5mg/kg (ABDALLA et al., 2008) diluído em PBS e administrado via subcutânea. O subgrupo Ia foi tratado apenas com PBS via subcutânea, representando, portanto, o respectivo controle do subgrupo I. O subgrupo II foi tratado com inibidor seletivo de COX-2, Celecoxibe (Pfizer Pharmaceuticals LLC, Guarulhos, SP, Brasil), a 5mg/kg (SHORT et al., 2013) diluído em água filtrada e administrado oralmente. O subgrupo IIa foi tratado apenas com água filtrada via oral, representando portanto o respectivo controle do subgrupo II.

As fêmeas receberam 100µl de Meloxicam ou PBS na forma subcutânea, 100µl de Celecoxibe ou água filtrada por via oral, após 24 horas da infecção. O tratamento foi realizado diariamente e no mesmo horário. Os animais foram monitorados para alteração de peso corporal e morbidade, que foram verificados imediatamente antes da infecção e no período pós-infecção, a cada 48 horas. Os parâmetros de peso e morbidade das fêmeas infectadas com ME49 foram verificados durante 40 dias consecutivos.

A morbidade foi avaliada com base nos parâmetros clínicos descritos por Bartley e colaboradores (2006), com poucas modificações: animal saudável, pêlo brilhante e esperto (score 0); animal com pêlo um pouco arrepiado e menos esperto (score 1); animal com pêlo mais arrepiado e com movimentação mais lenta (score 2); animal com pêlo

arrepiado e mais quieto na gaiola (score 3); animal com pêlo muito arrepiado, parado e abdômen inchado (score 4).

Após os respectivos intervalos de tempo de tratamento e infecção (40 dias), as fêmeas infectadas com a cepa ME49 foram anestesiadas com solução de xilazina 2% (Syntec) e cetamina 10% (Syntec), o sangue do plexo orbital coletado com uso de capilares de vidro e, posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. As amostras de sangue foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e o soro coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA. Em adição, o cérebro foi coletado para posterior análise da carga parasitária por PCR em tempo real e imuno-histoquímica.

4.4. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A concentração de DNA de *T. gondii* no cérebro das fêmeas derivadas dos grupos experimentais foi determinada por PCR em tempo real (*real time PCR*). Este órgão foi homogeneizado, pesado (20ng) e a extração do DNA realizada com o kit de purificação de DNA (Promega, São Paulo, SP, Brasil). Os ensaios para quantificar a carga parasitária no respectivo tecido foram realizados na máquina de PCR em tempo real StepOnePlus[®] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e o kit Master Mix Go Taq[®] (Promega Co.), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de reação foram seguidas conforme o protocolo descrito por Wahab e colaboradores (2010). Todas as amostras foram testadas em duplicata. Os primers utilizados para amplificação do DNA correspondente ao gene 529 de *T. gondii* (amplicon 50pb) foram: forward, 5'-GCTCCTCCAGCCGTCTTG-3', e reverse, 5'-TCCTCACCTCGCCTTCAT-3'. Taquizoítas da cepa RH foram utilizados como controle positivo da reação. Os valores obtidos para cada amostra foi calculado de acordo com a curva padrão (100ng de DNA) contendo sete pontos de diluição. Os dados foram analisados usando o software *Data Analysis and Technical Graphics* (Origin version 6.0; Microcal Software, Inc., Northampton, MA).

4.5. Imuno-histoquímica

Os cérebros das fêmeas dos grupos experimentais foram incluídos em parafina e analisados por imuno-histoquímica para a detecção de estruturas tipo cistos contendo bradizoítas de *T. gondii* no seu interior. Para este propósito, o material foi fixado em formol 10% tamponado com fosfato, desidratado em concentrações crescentes de álcool,

incluído em parafina, cortes com 4µm de espessura foram feitos em micrótomo e depositados em lâminas de vidro recobertas com solução aderente de Poli-L-lisina.

O tecido foi submetido à imuno-histoquímica para detecção de estruturas tipo cistos de *T. gondii*, de acordo com Barbosa e colaboradores (2012), com pequenas modificações. Brevemente, as lâminas contendo cortes histológicos foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em álcool de concentrações decrescentes e lavadas com água destilada. O bloqueio da fosfatase endógena foi feito com ácido acético 5% diluída em TRIS (*Tris-buffered saline*, TBS) e deixado 8 minutos a temperatura ambiente. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, cada lâmina foi incubada com 200µl de soro normal de cabra a 2% diluído em TBS e deixado 45 minutos a 37°C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com soro de *C. callosus* previamente infectado com *T. gondii* (cepa ME49) contendo anticorpos anti-*T. gondii*, na diluição de 1:50 em TBS por 12 horas a 4°C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lâminas foram incubadas com 200µl de anticorpo secundário anti-mouse biotilado (1:300) por 1 hora a 37°C. Depois de novas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC)-fosfatase alcalina (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens em TBS, a revelação da enzima fosfatase alcalina foi feita com *fast red-naftol* (Sigma-Aldrich, USA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 10 segundos, montadas em glicerina e o material analisado e fotografado em microscópio de luz Nikon, modelo Optiphot-2.

4.6. Ensaio de viabilidade celular - MTT

A viabilidade de macrófagos peritoneais frente aos tratamentos com Meloxicam (inibidor de COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (inibidor de COX-2) foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 96 poços na proporção de 1 x 10⁵ células por poço em 200 µl de meio RPMI a 10% de soro. Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os macrófagos peritoneais foram tratados ou não com concentrações crescentes de Meloxicam (0,25mg/ml; 0,5mg/ml e 1mg/ml) ou Celecoxibe (25ng/ml; 50ng/ml; 125ng/ml; 250ng/ml; 500ng/ml; 1µg/ml; 5µg/ml e 10µg/ml) por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram removidos das placas, coletados e armazenados a -80°C. As células foram incubadas com 90µl de meio a 10% de soro acrescido de 10µl de MTT (0,5mg/ml) em estufa durante 4 horas. Depois, os

sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan, produzidos pelas células viáveis que metabolizaram o MTT, foram solubilizados com 100µl de solução contendo SDS (Sigma) a 10% e N, N-dimetil formamida (Sigma) a 50%. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica (DO) foi obtida a 570nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) e os resultados foram expressos como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação aos controles (100%).

4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e MIF em amostras de soro de *C.callosus*

As concentrações de IFN- γ , MIF, TNF- α e IL-1 β no soro das fêmeas foram mensuradas por ELISA Captura, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos anti-citocinas murinas por 12 horas a temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas com PBS-Tween (0,05%) e bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente com PBS mais 1% de soro albumina bovina (BSA) para as citocinas TNF- α e MIF ou PBS mais 10% de SFB para IL-1 β e IFN- γ . Após novas lavagens em PBS-T, 50µl das curvas de cada citocina ou 50µl das amostras de sobrenadantes de soro de *C.callosus* foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpos de detecção anti-citocinas murinas conjugados com biotina durante 2 horas (MIF e TNF- α) e 1 hora (IL-1 β e IFN- γ) a temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada às placas e permaneceu em incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram demonstrados em pg/ml de acordo com a referência da curva padrão. O limite de detecção para IFN- γ , TNF- α , IL-1 β foi de 31,25pg/ml e para MIF de 125pg/ml.

4.8. Tratamento e infecção de macrófagos peritoneais

Após verificar o papel de COX-1 e COX-2 na infecção pela cepa ME49 de *T. gondii* em *C. callosus*, nosso próximo objetivo foi avaliar a influência destas mesmas enzimas

durante infecção pela cepa virulenta RH. Com este propósito, usamos como modelo experimental macrófagos peritoneais de *C. callosus*, uma vez que a infecção destes animais com taquizoítas de RH causam grande mortalidade em poucos dias, dificultando as mesmas análises experimentais realizadas com a cepa ME49.

Dessa forma, *C. callosus* foram tratados intraperitonealmente com 1ml de Tioglicolato de Sódio (Difco Fluid Thioglycollate Medium, BD Bioscience) à 3% para recrutamento peritoneal de macrófagos (RODRIGUES *et al.*, 2012). Após 72 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a lavagem do peritônio foi feita com 5ml de meio RPMI gelado isento de soro. As células peritoneais de aproximadamente 3 animais foram centrifugadas, contadas em câmara de newbauer, ajustadas para uma proporção de 1×10^5 células a cada 200µl de meio e as mesmas foram colocadas em placas de cultura de 96 poços, e deixadas aderir por 24 horas em meio RPMI (Cultilab) a 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 100U/mL de penicilina (Sigma) e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas em cultura, as células não aderentes foram retiradas dos poços de cultura por lavagens dos mesmos com meio RPMI a 10% de soro e as células aderidas foram consideradas macrófagos peritoneais (RODRIGUES *et al.*, 2012). Em seguida, os macrófagos peritoneais foram infectados com taquizoítas da cepa RH linhagem 2F1 de *T. gondii* na proporção de três parasitos por célula (3:1). Após 3 horas de infecção, os macrófagos infectados foram tratados com Meloxicam ou Celecoxib por adicionais 24 horas. Como controle, macrófagos não foram infectados e nem tratados, ou foram somente infectados ou ainda somente tratados com inibidores. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas (IL-6, MIF, TNF- α e IL-1 β) ou nitrito e as células processadas para ensaio de viabilidade celular e proliferação intracelular de *T. gondii*. Quatro experimentos independentes foram realizados em sextuplicata.

4.9. Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em macrófagos peritoneais tratadas com inibidores de COX

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 96 poços na proporção de 1×10^5 células por poço em 200 µl de meio RPMI a 10% de soro. Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os macrófagos foram infectados com *T. gondii* (cepa RH) na proporção 3:1 com meio a 2% de soro e incubados por 3 horas em estufa. Após esse

tempo, os macrófagos foram tratados com Meloxicam (0,25mg/ml; 0,5mg/ml e 1mg/ml) ou Celecoxibe (1µg/ml; 5µg/ml e 10µg/ml) em meio a 10% de soro e deixados por 24 horas. Como controle, as células foram infectadas e não tratadas. Após esse período, os sobrenadantes foram removidos das placas, coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas ou nitrito, e as células analisadas para proliferação intracelular de *T. gondii*.

O ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (RH) foi realizado de acordo com Teo e colaboradores (2007), com pequenas modificações. Brevemente, amostras de parasitos RH (curva padrão: de 1×10^6 a $15,625 \times 10^3$ parasitos totais) e macrófagos peritoneais infectados e tratados ou não com inibidores foram lisados com 100µl de tampão de lise RIPA [50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% (peso/volume) de deoxicolato de sódio e 0,1% (peso/volume) de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] (Sigma) durante 30 minutos, incubadas com 160µl de tampão de ensaio (PBS a 100mM pH7,3; 9mM de MgCl₂ e 102mM de β-mercaptoetanol) e 40µl de CPRG (chlorophenol red-D-galactopyranoside; Roche Diagnostic) a 6,25mM por adicionais 30 minutos. Após este período, a atividade enzimática da β-galactosidase foi mensurada a 570nm usando leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) e os dados foram apresentados como índice de proliferação de *T. gondii* (β-Gal) de acordo com a referência da curva padrão (limite de detecção da reação de $15,625 \times 10^3$ parasitos totais).

4.10. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de Captura para IL-6, MIF, TNF-α e IL-1β em sobrenadante de macrófagos peritoneais

As concentrações de IL-6, MIF, TNF-α e IL-1β no sobrenadante de macrófagos peritoneais foram mensurados por ELISA Captura, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems; BD Bioscience). Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos anti-citocinas murinas por 12 horas a temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas com PBS-T (0,05%) e bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente com PBS mais 1% de soro albumina bovina (BSA) para as citocinas TNF-α e MIF ou PBS mais 10% de SFB para IL-1β e IL-6. Após novas lavagens em PBS-T, 50µl das curvas de cada citocina ou 50µl das amostras de sobrenadantes de macrófagos peritoneais foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpos de detecção

anti-citocinas murinas conjugados com biotina durante 2 horas (MIF e TNF- α) e 1 hora (IL-1 β e IL-6) a temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada às placas e permaneceu em incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram demonstrados em pg/ml de acordo com a referência da curva padrão. O limite de detecção para IL-6, TNF- α e IL-1 β foi de 31,25pg/ml e para MIF de 125pg/ml.

4.11. Dosagem de nitrito

A concentração de nitrito foi determinada no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras foram adicionadas em placas de 96 poços, tratadas com sulfanilamida 1% e diidrocloreto de naftaleno - NEED 0.1% (na proporção 1:1) em H₃PO₄ 2.5%. A absorbância (A570) foi determinada em leitor para microplacas (Titertek® multiskan plus) com referência a uma curva padrão de nitrito de sódio – NaNO₂ (5-100 μ mol/L).

4.12. Análise estatística

Todos os dados foram analisados como média e erro padrão usando o programa GraphPad *Prisma versão 4.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni em casos de testes paramétricos; casos não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns; e as comparações entre condições pares foram realizadas pelo teste *t* de Student. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4.13. Normas de Biossegurança

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

5. RESULTADOS

5.1. Fêmeas infectadas pela cepa ME49 de *T. gondii* e tratadas com Celecoxibe perdem menos peso corporal

Após a infecção com 50 cistos da cepa ME49, fêmeas de *C. callosus* tratadas ou não com inibidores de COX foram observadas a cada 48 horas para avaliar a alteração de peso corporal e morbidade durante 40 dias de infecção (Figura 1).

As fêmeas infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratadas com o inibidor Celecoxibe (COX-2) e H₂O (controle) apresentaram pouca alteração no peso corporal nos primeiros dias de infecção mas, a partir do 10º dia de infecção, as fêmeas começaram a perder peso significativamente, com uma média de 5 a 8 gramas durante os 40 dias de monitoramento quando tratadas com Celecoxibe ou H₂O, respectivamente (Figura 1A). Observou-se perda significativa de peso nas fêmeas infectadas e tratadas com H₂O (controle) quando comparado às fêmeas infectadas e tratadas com Celecoxibe ($p < 0.05$) (Figura 1A). Já as fêmeas infectadas e tratadas com o inibidor Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou PBS (controle) apresentaram alteração no peso corporal também a partir do 10º dia de infecção, porém, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 1B).

Com relação à morbidade (Figura 2), fêmeas infectadas com a cepa ME49 e tratadas com o inibidor Celecoxibe (COX-2) começaram a apresentar pêlo arrepiado após o 4º dia de infecção em comparação aos animais tratados com H₂O (controle), que só começaram a apresentar sintomatologia a partir do 8º dia de infecção (Figura 2A). Não houve diferença estatística entre os grupos Celecoxibe e H₂O com relação aos escores de morbidade, mas em ambas as condições as fêmeas apresentaram pêlo arrepiado e tornaram-se menos espertas e ágeis nas gaiolas (Figura 2A). Na presença de tratamento por Meloxicam ou PBS (controle), as fêmeas iniciaram a sintomatologia a partir do 10º dia de infecção, e também não houve diferença estatística entre os grupos, já que o tratamento por Meloxicam ou sua ausência (PBS) causaram scores de morbidade similares (Figura 2B).

5.2.A inibição de COX1 ou COX2 reduz significativamente o parasitismo cerebral em *C. callosus* infectados pela cepa ME49 de *T. gondii*

Após a infecção com 50 cistos da cepa ME49, fêmeas de *C. callosus* tratadas ou não com inibidores de COX durante 40 dias foram eutanasiadas e os cérebros coletados para análise parasitológica. O parasitismo tecidual foi quantificado por qPCR e detectado por imuno-histoquímica (Figura 3).

Fêmeas infectadas com a cepa ME49 e tratadas com H₂O (controle) apresentaram maior número de parasitos em comparação às fêmeas tratadas com o inibidor Celecoxibe (COX-2) ($p < 0,05$) (Figura 3A). O mesmo fenômeno ocorreu com o outro grupo

experimental. Fêmeas infectadas com a cepa ME49 e tratadas com PBS (controle) apresentaram maior número de parasitos em comparação às fêmeas tratadas com o inibidor Meloxicam (COX-1 e COX-2) ($p < 0,05$) (Figura 3B).

A imuno-histoquímica confirmou uma maior presença e aglomeração de estruturas tipo cistos contendo parasitos no seu interior em cérebro de fêmeas infectadas com ME49 e tratadas com H₂O ou PBS (Figura 3C-D). Já as fêmeas que foram tratadas com os inibidores Celecoxibe ou Meloxicam apresentaram uma quantidade menor de estruturas tipo cistos, e estas estruturas demonstraram uma distribuição mais dispersa no tecido cerebral (Figura 3E-F).

5.3. Maior produção de MIF é observada em fêmeas infectadas pela cepa ME49 de *T. gondii* e tratadas com Meloxicam

Com a finalidade de observar os mecanismos de resposta imune através da produção de citocinas, o soro de fêmeas infectadas por *T. gondii* (cepa ME49) e tratadas ou não com inibidores de COX foi mensurado para detecção de MIF, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β por ELISA.

Fêmeas não infectadas e não tratadas apresentaram baixa produção de MIF (Figura 4A). No entanto, na presença de infecção e tratamento com Meloxicam ou PBS, foi induzido um aumento significativo na produção de MIF em relação às fêmeas não infectadas e não tratadas ($p < 0,05$) (Figura 4A). Interessantemente, pôde-se observar que as fêmeas tratadas com o inibidor Meloxicam apresentaram uma tendência para maior produção de MIF quando comparadas ao controle PBS (Figura 4A). Por outro lado, fêmeas infectadas e tratadas com H₂O ou Celecoxibe apresentaram produção de MIF níveis basais ou semelhante ao controle não infectado. (Figura 4A).

De modo similar ao MIF, fêmeas não infectadas e não tratadas apresentaram baixa produção de IL-1 β (Figura 4B). No entanto, na presença de infecção e tratamento com Meloxicam ou PBS, foi induzido um aumento significativo na produção de IL-1 β em relação às fêmeas não infectadas e não tratadas ($p < 0,05$) (Figura 4B). Não houve diferença estatística na produção de IL-1 β quando comparamos fêmeas infectadas e tratadas com PBS com fêmeas infectadas e tratadas com Meloxicam (Figura 4B). Fêmeas infectadas e tratadas com H₂O ou Celecoxibe apresentaram produção de IL-1 β níveis basais ou semelhante ao controle não infectado (Figura 4B).

Finalmente, não houve diferença estatística na produção de TNF- α quando comparamos o soro de fêmeas não infectadas e não tratadas ou fêmeas infectadas e tratadas com PBS, H₂O, Meloxicam ou Celecoxibe (Figura 4C).

A produção de IFN- γ no soro das fêmeas esteve abaixo do limite de detecção (dados não mostrados).

5.4. O tratamento de macrófagos peritoneais de *C. callosus* com inibidores de COX não induz alteração da viabilidade celular

Após a obtenção das células peritoneais de *C. callosus* e seu plaqueamento em placas de 96 poços, macrófagos peritoneais infectados com a cepa RH de *T.gondii* e tratados ou não com inibidores de COX foram utilizados para a realização de ensaios de viabilidade celular e proliferação intracelular de *T.gondii*. O ensaio imunoenzimático ELISA e a dosagem de nitrito foram feitos com o sobrenadante dos macrófagos peritoneais (Figura 5).

Para determinar a viabilidade dos macrófagos peritoneais de *C.callosus* frente aos inibidores de COX, as células foram tratadas com diferentes concentrações de Meloxicam (25mg/ml; 0,5mg/ml e 1mg/ml) ou Celecoxibe (25ng/ml; 50ng/ml; 125ng/ml; 250ng/ml; 500ng/ml; 1 μ g/ml; 5 μ g/ml e 10 μ g/ml). Após 24 horas, utilizando um ensaio colorimétrico de MTT observou-se que os inibidores de COX não apresentaram atividade citotóxica quando comparados com macrófagos peritoneais não tratados ($p < 0,05$).

5.5. Inibidores de COX reduzem significativamente a proliferação intracelular de *T.gondii* (cepa RH) em macrófagos peritoneais de *C. callosus*

Para determinar o papel dos inibidores de COX na proliferação de *T.gondii* em macrófagos peritoneais, estas células foram tratadas com concentrações crescentes de Meloxicam (0,25mg/ml; 0,5mg/ml e 1mg/ml) ou Celecoxibe (1 μ g/ml; 5 μ g/ml e 10 μ g/ml) (Figura 6).

Os resultados demonstraram que o tratamento com Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2) promoveu uma significativa redução na proliferação intracelular de *T.gondii* (cepa RH) em macrófagos peritoneais de *C.callosus* quando comparados com macrófagos peritoneais infectados e não tratados com inibidores ($p < 0,05$) (Figura 6). Nossos resultados apresentaram diferença significativa entre as diversas concentrações utilizadas, com isso podemos perceber que a inibição ocorreu de forma dose dependente ($p < 0,05$) (Figura 6).

Assim, a inibição da enzima ciclooxigenase e, conseqüentemente, a inibição de PGE₂, usando Meloxicam ou Celecoxibe favoreceu o controle da infecção por *T. gondii* em macrófagos peritoneais de *C. callosus*.

5.6. Inibidores de COX induzem maior produção de TNF- α e menor produção de IL-6 em macrófagos peritoneais de *C. callosus*

Com a finalidade de observar a resposta imune através da mensuração de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais infectados por *T. gondii* (cepa RH) e tratados com inibidores de COX, os níveis de MIF, TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram quantificados por ELISA (Figura 7).

Os resultados demonstraram que não houve diferença na produção de MIF (Figura 7A) em células tratadas com inibidores Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2) em relação a células não tratadas, independentemente da presença de *T. gondii*. A produção de IL-1 β no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais infectados ou não com *T. gondii* esteve abaixo do limite de detecção (dados não mostrados).

Por outro lado, em relação à produção de TNF- α , macrófagos não infectados e tratados com o inibidor Celecoxibe (COX-2), independentemente da concentração usada, apresentaram de forma significativa maior produção desta citocina em comparação a células não tratadas e não infectadas ($p < 0.05$) (Figura 7B). Quando macrófagos não infectados foram tratados com Meloxicam, houve uma tendência em aumentar a produção de TNF- α em relação às células não tratadas e não infectadas, porém sem diferença estatística (Figura 7B). Após a infecção, observou-se que o tratamento com ambos os inibidores (Meloxicam ou Celecoxibe) induziu maior produção de TNF- α quando comparado às células infectadas e não tratadas ($p < 0,05$) (Figura 7B).

Macrófagos peritoneais não infectados e tratados com inibidores Meloxicam e Celecoxibe apresentaram uma diminuição significativa de IL-6 em relação ao seu controle (macrófagos não infectados e não tratados). Adicionalmente, a produção de IL-6 foi significativamente menor após a infecção por *T. gondii* e/ou tratamento com os inibidores Meloxicam ou Celecoxibe em comparação aos macrófagos peritoneais não infectados e não tratados ($p < 0,05$) (Figura 7C).

5.7. Inibidores de COX aumentam a produção de nitrito em macrófagos peritoneais de *C. callosus*

Para averiguar a dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais infectados por *T. gondii* e tratados com inibidores Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2), realizou-o ensaio de Griess (Figura 8).

De um modo geral, os resultados evidenciaram que macrófagos tratados com inibidores Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2) induziram alta produção de nitrito em comparação aos macrófagos não tratados, independentemente da infecção pelo parasito (Figura 8). Após a infecção por *T. gondii* (cepa RH) a produção de nitrito foi aumentada em macrófagos tratados com Meloxicam (COX-1 e COX-2), exceto para a concentração de 5µg/ml ($p<0,05$). Já em macrófagos infectados por *T. gondii* (cepa RH) e tratados com Celecoxibe (COX-2) a produção de nitrito aumentou somente na maior concentração avaliada (10µg/ml) ($p<0,05$) (Figura 8).

6. DISCUSSÃO

As PGs são importantes mediadores que regulam diversas funções no sistema cardiovascular, gastrointestinal, urogenital e nervoso, além de desempenhar papéis críticos na imunidade e inflamação. A síntese de PGE₂ se dá a partir da conversão do AA pela enzima COX, que apresenta duas diferentes isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutiva e responsável pela produção de PGs na maioria dos tecidos (KIRKBY *et al.*, 2012). Em contraste, a COX-2 é induzível, expressa em locais de inflamação, infecção e câncer (NANDAKISHORE *et al.*, 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) atuam inibindo a enzima COX e sua toxicidade é geralmente atribuída ao bloqueio da atividade da COX-1 e COX-2, causando efeitos adversos (BRATER *et al.*, 2001). O inibidor seletivo da COX-2, Celecoxibe, pode exibir pouco ou nenhum efeito sobre a COX-1, quando empregados nas doses clínicas recomendáveis. O uso de coxibes se baseia em efeito anti-inflamatório pela atuação na inibição das prostaglandinas geradas através da enzima COX-2 (BRATER *et al.*, 2001). Desta forma, o presente estudo avaliou o papel funcional da COX-1 e COX-2 durante infecção causada pelas cepas ME49 e RH de *T. gondii*.

A cepa RH (tipo I) apresenta alta virulência e causa uma rápida mortalidade em camundongos (HOWE; SIBLEY, 1995). Em humanos, esta cepa pode causar doenças oculares graves (VALLOCHI *et al.*, 2005; COMMODARO *et al.*, 2009). A cepa ME49 (tipo II) é considerada moderadamente virulenta, levando à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos (HOWE; SIBLEY, 1995).

Visto que PGs em conjunto com NO e TNF- α participam de um circuito que controla a linfoproliferação e produção de citocinas na infecção por *T. cruzi* (PINGE-FILHO *et al.*, 1999), acredita-se que PGs estejam envolvidas na produção de um estresse oxidativo associado à anemia e, conseqüentemente à perda de peso. Nossos resultados demonstraram que animais tratados com o inibidor Meloxicam, que atua na inibição de COX-1 e COX-2, apresentaram perda de peso a partir do décimo dia de infecção com *T. gondii* assim como seu controle (PBS), não havendo diferença significativa. Já os animais tratados com o Celecoxibe (seletivo para inibição de COX-2) exibiram menor perda de peso após a infecção com *T. gondii* em relação ao seu controle (H₂O). Esta menor perda de peso em animais tratados com Celecoxibe pode estar relacionada com a diminuição da carga parasitária cerebral nestes animais, apesar das manifestações clínicas terem sido bem precoces (iniciais), ou seja, a partir do 4º dia de infecção se comparado ao respectivo controle. A partir do décimo dia de infecção, os animais tratados com ambos inibidores e

seus respectivos controles apresentaram mudanças crescentes nos escores de morbidade, porém sem taxas de mortalidade. Portanto, nossos resultados demonstram que a inibição seletiva de COX-2 parece ter maior influência no controle do peso corporal, porém sem afetar os sintomas clínicos de morbidade e mortalidade no animal. Alguns estudos estão de acordo com nossos resultados. Animais BALB/c infectados por *T. cruzi* foram tratados com Celecoxibe, não houve significativa alteração na morbidade em relação a animais não tratados e também não houve mortalidade, porém observou-se menor parasitemia (TATAKIHARA *et al.*, 2008). No entanto, vários estudos demonstraram que a inibição das COX altera significativamente a mortalidade quando animais são infectados por *T. cruzi* (MICHELIN; SILVA; CUNHA, 2005; ABDALLA *et al.*, 2008). Freire-De-Lima e colaboradores (2000) demonstraram que a inibição da produção de PGs por inibidores de COX atrasou a mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi* e diminuiu a parasitemia, sugerindo que a inibição das ciclooxigenases apresenta potencial terapêutico no controle da replicação de *T. cruzi* em camundongos, controlando a propagação da doença de Chagas.

Nossos resultados demonstraram, por meio da análise qPCR feita no tecido cerebral de *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii*, que animais tratados com os inibidores Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2) apresentaram de forma significativa redução no parasitismo quando comparado aos seus respectivos controles (PBS e H₂O). O mesmo ocorreu com os experimentos *in vitro*, no qual cultura de macrófagos peritoneais de *C. callosus* infectados com a cepa RH de *T. gondii* e tratados com inibidores Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2) apresentaram uma diminuição significativa na carga parasitária quando comparados com macrófagos peritoneais infectados e não tratados. Vários estudos anteriores corroboram com nossos resultados. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com ácido acetil salicílico (ASA) (inibidor COX-1 e COX-2) inibiu significativamente a internalização de tripomastigotas de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais de camundongos, confirmando a ideia de que COX desempenha um papel fundamental no processo de invasão deste parasito (MALVEZI *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento com os inibidores de COX, Meloxicam ou Etoricoxibe, reduziu significativamente a produção de PGE₂ em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *T. cruzi* e, ao mesmo tempo, diminuiu o número de tripomastigotas no sangue destes animais (MICHELIN; SILVA; CUNHA, 2005). Por outro lado, cardiomiócitos murinos infectados por *T. cruzi* produziram quantidades significantes de PGE₂ em cultura e, ao mesmo tempo,

camundongos nocautes para fosfolipase A₂, enzima necessária para a expressão de COX-2 e PGE₂, tiveram menor taxa de sobrevivência quando infectados por *T. cruzi*, demonstrando a importância destes mediadores durante a infecção por este parasito (SHARMA *et al.*, 2013). Em adição, a proliferação de *Leishmania* em macrófagos murinos foi favorecida pela alta expressão de COX-2 e PGE₂, uma vez que a enzima COX-2 quando bloqueada reduziu significativamente a proliferação parasitária (BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2006). A expressão de COX-2 e PGE₂ também estão relacionadas com o aumento da translocação bacteriana na mucosa intestinal de camundongos, induzindo desta forma inflamação intestinal devido ao aumento da carga bacteriana no local (SHORT *et al.*, 2013). Interessantemente, a infecção por *T. gondii* pela cepa RH induziu a expressão de COX-2 em células musculares esqueléticas de camundongos, ocorreu um aumento na conversão de taquizoítas em bradizoítas, induzindo a fase crônica da infecção (GOMES *et al.*, 2014). Também, macrófagos peritoneais de camundongos infectados por *T. gondii* aumentam o acúmulo intracelular de corpos lipídicos, organelas que são fontes ricas de PGE₂. Estes macrófagos são menos efetivos na resposta imune contra *T. gondii*, entretanto se estes macrófagos são tratados com inibidor de PGE₂ (*indomethacin*), a atividade microbicida dessas células aumenta consideravelmente, confirmando o efeito favorável de COX-2 e PGE₂ na replicação intracelular deste parasito (MOTA *et al.*, 2014). Ainda não se sabe especificamente o papel exato de COXs e PGE₂ na resposta imune contra essas parasitoses, incluindo *T. gondii*. Especula-se que a enzima COX-2, ao regular a síntese de PGE₂, cause atividade imunossupressora e vasodilatadora, o que facilitaria a invasão patogênica (TSATSANIS *et al.*, 2006). Portanto, é possível concluir que as ciclooxigenases, COX-1 e COX-2, e, conseqüentemente PGE₂, são mediadores inflamatórios importantes que favorecem a infecção por *T. gondii* e outros patógenos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, independentemente do tipo de cepa abordada.

A infecção causada por *T. gondii* induz uma resposta imune do tipo Th1 com a produção de citocina pró-inflamatórias, como IFN- γ , MIF, IL-6, IL-12 e TNF- α (KELLY *et al.*, 2005; PASSOS *et al.*, 2010). De acordo com Michelin e colaboradores (2005) camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com inibidores de COX apresentaram uma redução na produção de TNF- α e IFN- γ . Além disso, Freire-de-Lima e colaboradores (2000) demonstraram que PGE₂ pode inibir a resposta imune tipo Th1 e reduzir significativamente a produção de TNF- α e NO. Com isso, a inibição de COX-2 e, conseqüentemente de PGE₂, poderia restabelecer a expressão de citocinas Th1, como IL-

2 e IFN- γ , bem como a síntese de NO. Com relação às dosagens por ELISA de TNF- α e IL-1 β no soro dos animais, nossos resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa entre aqueles animais tratados com inibidores de COX e seus respectivos controles. Já em relação à dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de *C. callosus* infectados com *T. gondii*, nossos resultados estão de acordo com Freire-de-Lima e colaboradores (2000), pois os macrófagos tratados com inibidores Meloxicam ou Celecoxibe apresentaram um aumento significativo na produção de TNF- α e NO, sugerindo que a inibição da PGE₂ favorece a atividade microbicida de macrófagos. Um outro estudo ainda ressaltou que ocorre uma associação entre corpos lipídicos e vacúolo parasitóforo de *T. gondii* em macrófagos peritoneais de camundongos e esta associação induz uma atividade microbicida deficiente, por haver um aumento de PGE₂ e uma diminuição de NO, evidenciando que PGE₂ favorece a proliferação intracelular de *T. gondii* nestas células (MOTA *et al.*, 2014).

MIF possui inúmeras funções, sendo um regulador chave da imunidade inata e adquirida, importante na indução da resposta inflamatória a vírus e bactérias (CALANDRA *et al.*, 1995) e tem a propriedade de ativar macrófagos e promover a morte de parasitos intracelulares, como *T. gondii* (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998; GOMES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2014). Em modelo de infecção para *T. cruzi* observou-se aumento da suscetibilidade de camundongos MIF-/- à infecção pelo parasito. Este aumento ocorreu devido aos níveis reduzidos de citocinas pro-inflamatórias tais como TNF- α , IL-12, IL-18 e IFN- γ (REYS *et al.*, 2006). Com isso, mostrou-se o papel de MIF em controlar a fase aguda da infecção por estes parasitos. Nossos resultados apresentaram uma maior tendência na produção de MIF no soro dos animais que foram tratados com Meloxicam (inibidor COX-1 e COX-2), o que poderia explicar a menor carga parasitária no cérebro de animais tratados com este inibidor. De acordo com estudos recentes, MIF, ERK1/2 e PGE₂ participam dos mecanismos de replicação de *T. gondii* em células BeWo (BARBOSA *et al.*; 2014), assim podemos hipotetizar que MIF também possa controlar a via ERK1/2 e produção de PGE₂ em *C. callosus*, participando efetivamente da resposta a este parasito. Outros estudos que analisaram as funções de MIF demonstraram que vilos de placentas humanas infectados com *T. gondii* mostraram-se mais resistentes à infecção quando tratados com esta citocina (GOMES *et al.*, 2011). De acordo com Calandra e colaboradores (1994), TNF- α e IFN- γ são potentes indutores da secreção de MIF por macrófagos *in vitro*. MIF também foi encontrado induzindo secreção de TNF- α em macrófagos, sugerindo que a MIF e TNF- α podem agir em

conjunto para aumentar as respostas pró-inflamatórias. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois macrófagos peritoneais tratados com inibidores de COX demonstraram um aumento significativo de TNF- α e uma maior tendência na produção de MIF e IL-1 β . Em macrófagos infectados com *T. cruzi*, a inibição de COX está relacionada com o aumento de IL-1 β , que também poderia explicar o aumento da atividade antiparasitária de macrófagos. De fato, a IL-1 β é crítica para a restrição da infecção por *L. amazonensis* (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013) e demonstrou-se que os macrófagos tratados com IL-1 β apresentam menos tripomastigotas do que macrófagos sem tratamento. A IL-1 β desencadeia a liberação NO em macrófagos infectados com *T. cruzi* de um modo dose dependente (SILVA *et al.*, 2013).

IL-6 é uma citocina pleiotrópica e de difícil classificação como pró-ou anti-inflamatória. É descrita como pró-inflamatória, principalmente por se apresentar mais elevada nas fases iniciais de uma infecção (PASSOS *et al.*, 2010). Entretanto, alguns estudos relacionaram níveis elevados de IL-6 com a supressão de processos inflamatórios, permitindo classificá-la como uma citocina anti-inflamatória (TILG; DINARELLO; MILLER, 1997; STEENBERG *et al.*, 2003). IL-6 também já foi descrita como uma citocina importante para o controle da disseminação de infecções com *Giardia duodenalis* (KAMDA; NASH; SINGER, 2012), na resposta imune protetora contra *T. cruzi* (GAO; PEREIRA, 2002) e na limitação da multiplicação microbiana durante infecção com *Listeria monocytogenes* (KOPF *et al.*, 1994, DALRYMPLE *et al.*, 1995), *Vaccinia vírus* (KOPF *et al.*, 1994) e *Candida albicans* (ROMANI *et al.*, 1996).

Estudos anteriores demonstraram que camundongos IL6^{-/-} e infectados com *T. gondii* falharam no desenvolvimento de resposta pró-inflamatória inata, a qual é essencial para limitar a replicação do parasito (JEBBARI *et al.*, 1998). De acordo com Castro e colaboradores (2013), a IL-6 está envolvida no controle da proliferação de *T. gondii*, uma vez que, ao tratar células THP-1 com a citocina recombinante, o nível do parasitismo diminuiu e ao tratar essas células com anti-IL-6 o parasitismo aumentou. Porém nossos resultados não estão de acordo com a literatura, pois macrófagos peritoneais de *C. callosus* infectados ou não com a cepa RH de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX apresentaram uma diminuição significativa na produção de IL-6 quando comparado com macrófagos peritoneais não infectados e não tratados. Entretanto o envolvimento de outras citocinas chaves na resposta que controla a infecção por *T. gondii* foi alterada o que permite sugerir que o menor parasitismo não é dependente de IL-6.

Considerando todos os nossos dados, é possível concluir que as ciclooxigenases, COX-1 e COX-2, são igualmente importantes durante uma infecção por *T. gondii*, uma vez que os seus bloqueios pelo uso de inibidores induziram uma redução na infecção cerebral de *C. callosus* quando infectados com a cepa ME49, bem como as taxas de proliferação intracelular do parasito em macrófagos peritoneais quando infectados com a cepa RH. Possivelmente, esta redução na infecção nos modelos *in vivo* e *in vitro* são resultado da regulação da resposta imune mediada pelos inibidores, já que houve modulação positiva de citocinas pró-inflamatórias importantes na defesa contra *T. gondii*. Contudo, outros estudos devem ser realizados para melhor esclarecimento do mecanismo envolvido na resposta contra *T. gondii* e participação de COX, como a avaliação da imunopatologia cerebral e o uso de linhagens celulares de origem humana para podermos verificar se o mesmo mecanismo se aplica a células humanas. Estes resultados serão importantes para compreender a ação das COXs na produção de citocinas e na susceptibilidade a infecção por *T. gondii*. Bloqueio das COXs pode estar associado a um melhor controle do processo infeccioso.

7. CONCLUSÃO

- *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com inibidor Celecoxibe (COX-2) apresenta uma menor perda de peso quando comparado com controle (H₂O). Animais tratados com inibidor Meloxicam (COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (COX-2) apresentam aumento nos escores de morbidade porém sem diferenças significativas quando comparados com controle.
- *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com inibidores Meloxicam ou Celecoxibe apresentam uma tendência a maior produção de MIF quando comparado com seus controles.
- Tecido cerebral de *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* apresenta um número menor de parasitos quando tratados com inibidores Meloxicam (COX-1 e COX-2) e Celecoxibe (COX-2) em relação aos seus controles.
- Macrófagos peritoneais de *C. callosus* infectados com a cepa RH de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX apresenta uma redução significativa na carga parasitária.
- Macrófagos peritoneais de *C. callosus* infectados com a cepa RH de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX apresentam alta produção de TNF- α e NO, e uma baixa secreção de IL-6.
- PGE₂, COX-1 e COX-2 são importantes em respostas inflamatórias ativadas por processos de origem infecciosa ou não, parecem exercer uma função imunomodulatória que busca prevenir uma exacerbada reação inflamatória que, muitas vezes, pode favorecer a disseminação de microorganismos patogênicos pelo organismo hospedeiro.

Figura 1

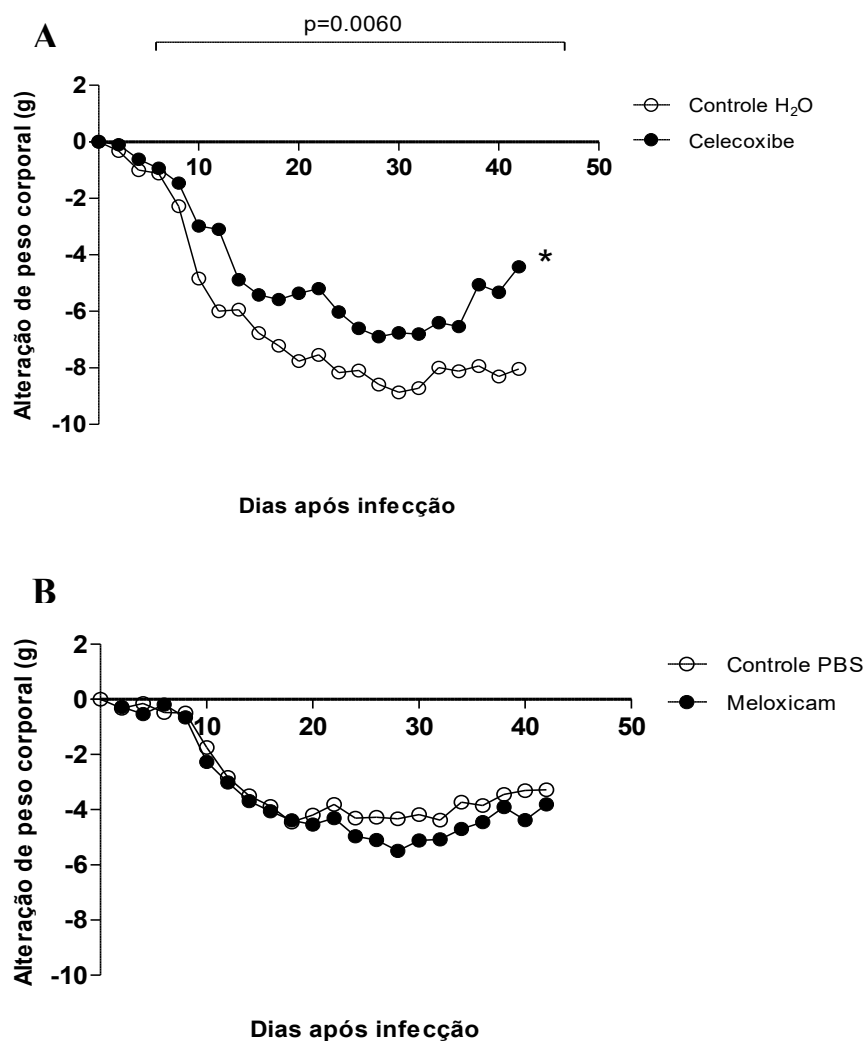


Figura 1: Alteração de peso corporal de *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX-2 (Celecoxibe) (A) ou COX-1/COX-2 (Meloxicam) (B) e seus respectivos controles. As fêmeas foram infectadas com 50 cistos de *T. gondii* e o tratamento ocorreu durante 40 dias consecutivos. Os animais foram monitorados a cada 48 horas para observação de peso corporal. *Comparação entre animais tratados com inibidores de COX e seus respectivos controles (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 2

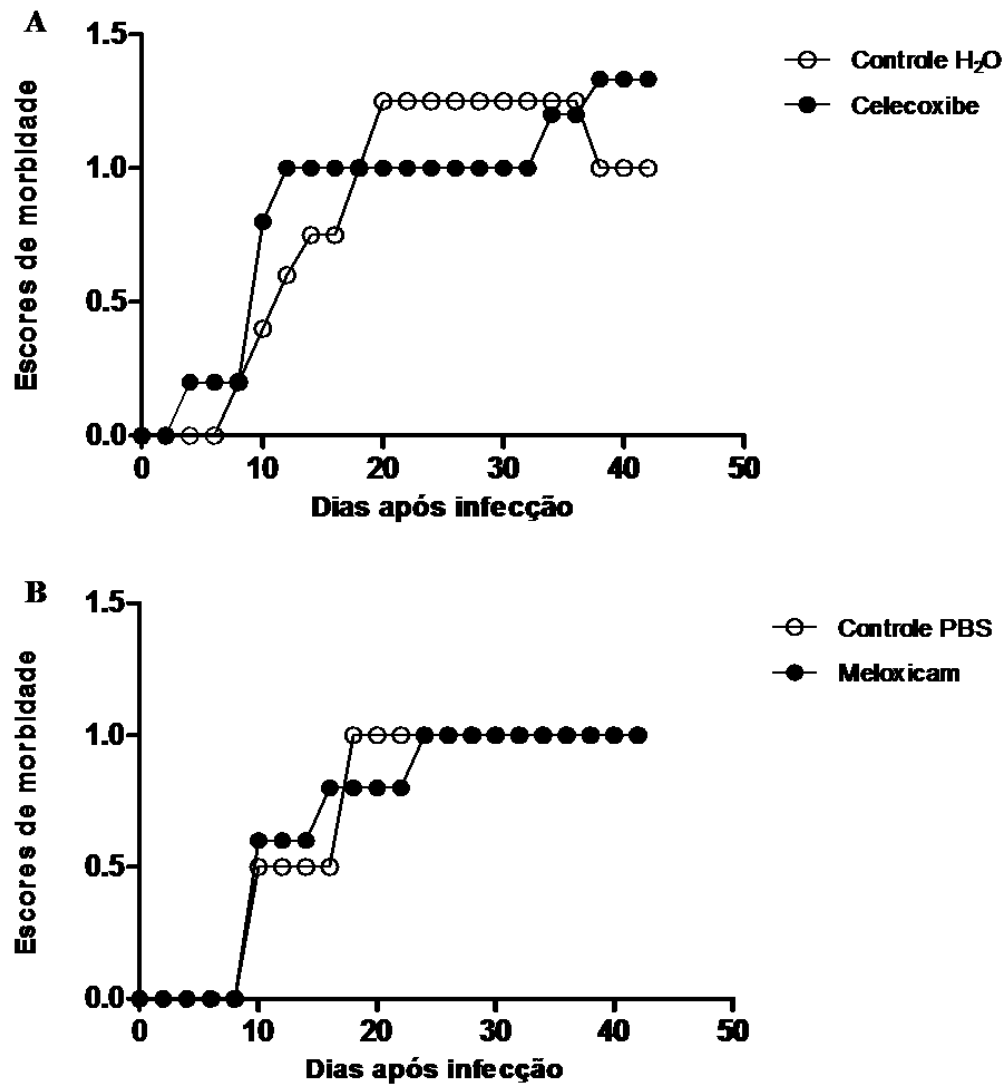


Figura 2: Escores de morbidade em *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX-2 (Celecoxibe) (A) ou COX-1/COX-2 (Meloxicam) (B) e seus respectivos controles. As fêmeas foram infectadas com 50 cistos de *T. gondii* e o tratamento ocorreu durante 40 dias consecutivos. Os animais foram monitorados a cada 48 horas para observação de alteração de morbidade. *Comparação entre animais tratados com inibidores de COX e seus respectivos controles (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 3

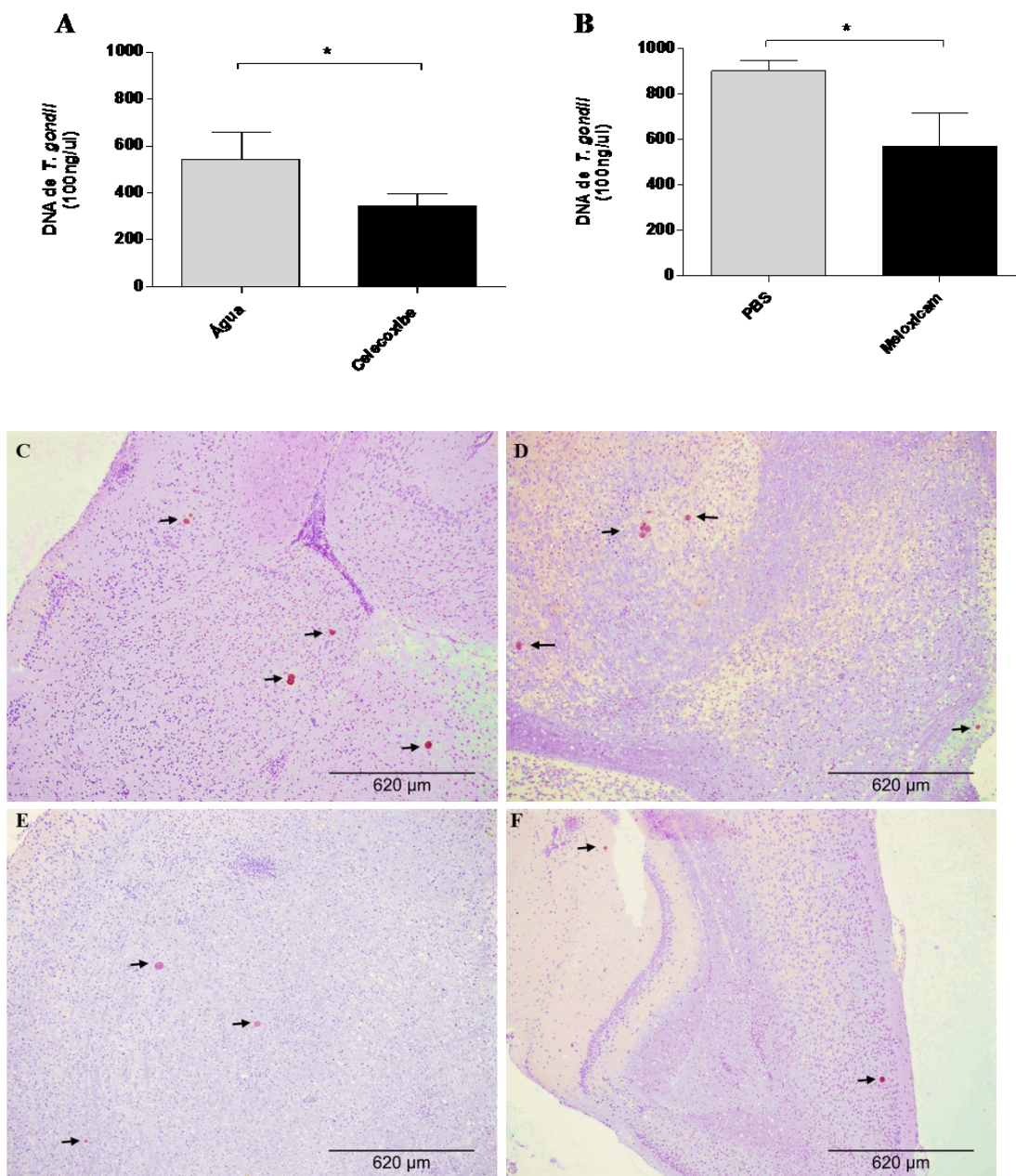


Figura 3: Carga parasitária cerebral de *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX-2 (Celecoxibe) (A) ou COX-1/COX-2 (Meloxicam) (B) durante 40 dias consecutivos. Após 40 dias de infecção e tratamento, as fêmeas foram eutanasiadas e o cérebro coletado para análise do parasitismo por PCR em tempo real. Paralelamente, imuno-histoquímica foi realizada nos cérebros de fêmeas tratadas com H₂O (C) ou PBS (D), ou tratadas com os inibidores Celecoxibe (E) ou Meloxicam (F). * Diferença entre os grupos tratados com inibidores de COX e seus respectivos controles (One-Way ANOVA, pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 4

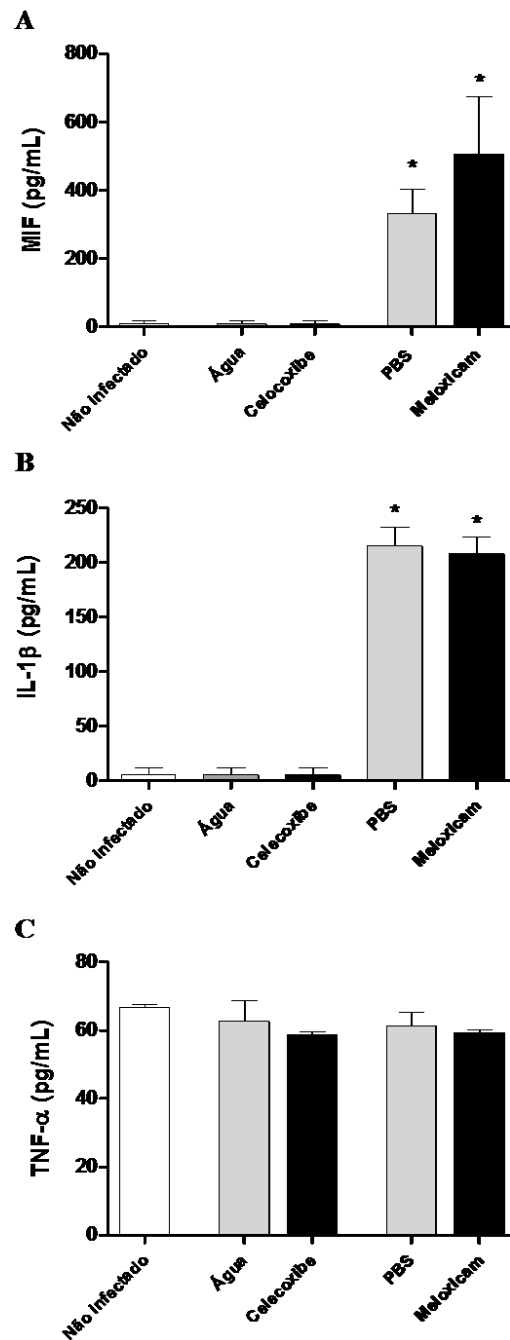


Figura 4: Análise da produção de citocinas MIF (A), IL-1 β (B) e TNF- α (C) em soro de *C. callosus* infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com inibidores de COX e seus respectivos controles após 40 dias de infecção e tratamento. *Comparação entre animais infectados e tratados ou não com inibidores de COX e animais não infectados (One-Way ANOVA, pós teste de Dunns, $p < 0,05$).

Figura 5

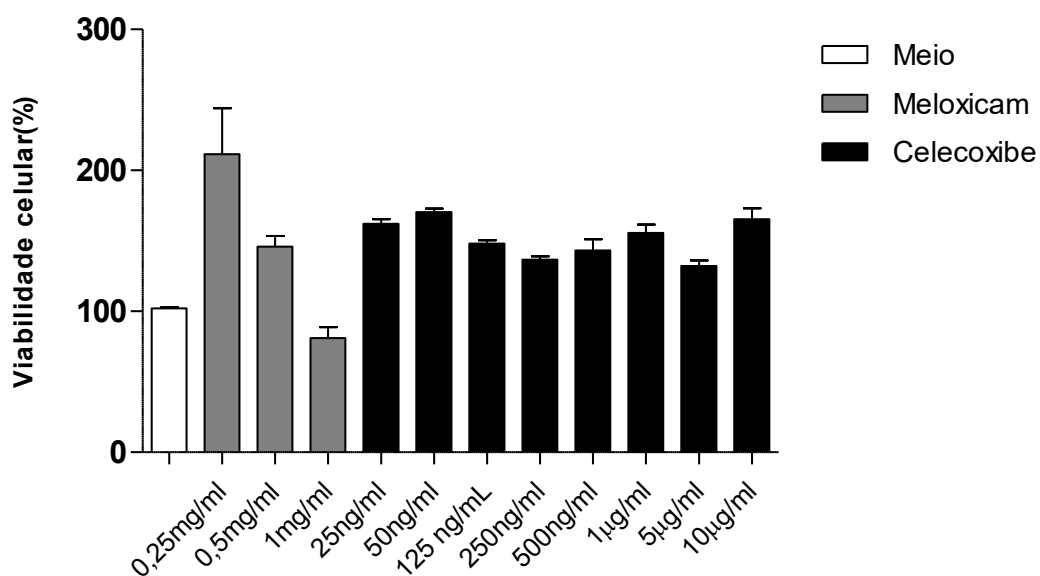


Figura 5: Viabilidade de macrófagos peritoneais de *C. callosus* tratados com concentrações crescentes de inibidores de COX. Macrófagos de *C. callosus* previamente tratados com tioglicolato foram retirados da cavidade peritoneal destes animais, adicionados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 1×10^5 células por poço em 200 μ l de meio RPMI a 10% de soro e, após 24 horas, as células foram tratadas ou não com concentrações crescentes de Celecoxibe ou Meloxicam por adicionais 24 horas. Em seguida, MTT foi adicionado às placas e a viabilidade celular foi calculada.

Figura 6

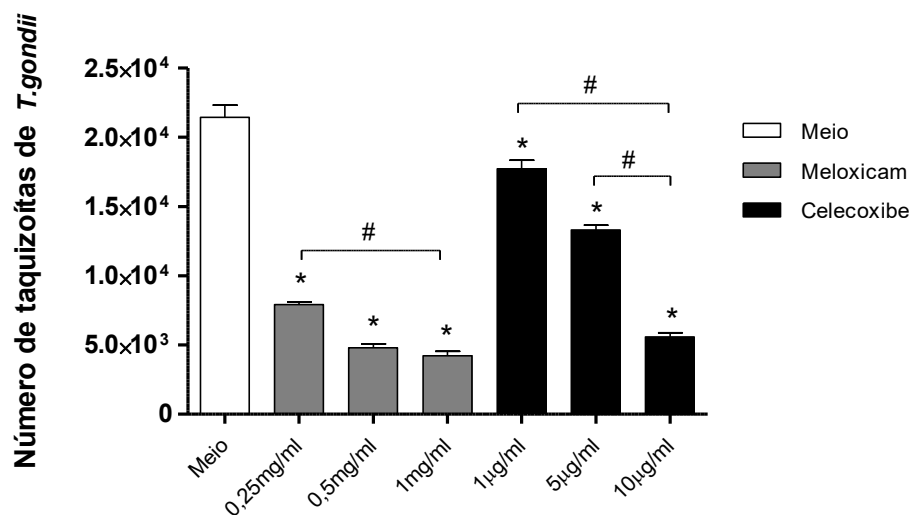


Figura 6: Número de taquizoítas de *T. gondii* em macrófagos peritoneais de *C. callosus* tratados com concentrações crescentes de inibidores de COX. Macrófagos de *C. callosus* previamente tratados com tioglicolato foram retirados da cavidade peritoneal destes animais, adicionados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 1×10^5 células por poço em 200 μ l de meio RPMI a 10% de soro e, após 24 horas, as células foram infectadas por *T. gondii* (cepa RH), na proporção 3:1, por 3 horas e tratadas ou não com concentrações crescentes de Celecoxibe ou Meloxicam por adicionais 24 horas. Em seguida, a reação colorimétrica de β -galactosidase foi realizada e o parasitismo calculado. *Comparação entre macrófagos tratados com inibidores de COX e não tratados (meio) (One-Way ANOVA, pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$), # Comparação entre macrófagos tratados com concentrações crescentes de inibidores de COX (One-Way ANOVA, pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 7

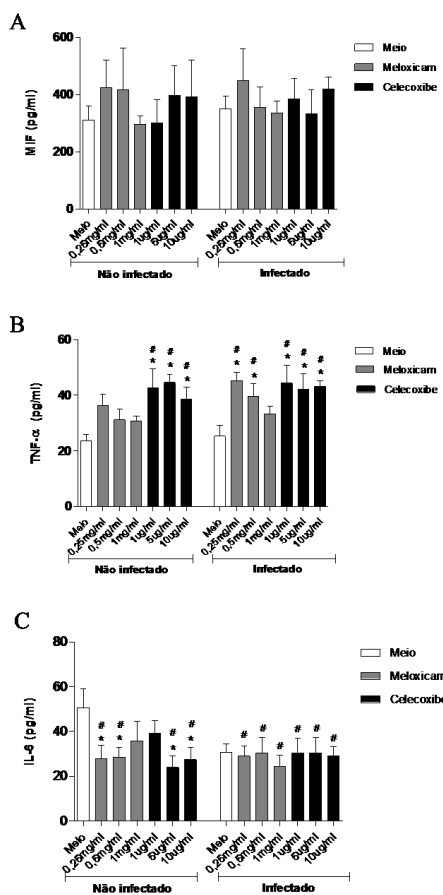


Figura 7: Detecção de citocinas em macrófagos peritoneais de *C. callosus* tratados com concentrações crescentes de inibidores de COX. Macrófagos de *C. callosus* previamente tratados com tioglicolato foram retirados da cavidade peritoneal destes animais, adicionados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 1×10^5 células por poço em 200 μ l de meio RPMI a 10% de soro e, após 24 horas, as células foram infectadas ou não por *T. gondii* (cepa RH) na proporção 3:1 por 3 horas e tratadas ou não com concentrações crescentes de Celecoxibe ou Meloxicam por adicionais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados, armazenados a -80°C para posterior dosagem de MIF (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) por ELISA. *Comparação entre macrófagos infectados ou não e tratados com inibidores de COX com seus respectivos controles (meio) (One-Way ANOVA, pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$), #Comparação entre a macrófagos peritoneais infectados ou não e tratados com inibidores de COX com macrófagos não infectados e não tratados (One-Way ANOVA, pós teste de Bonferroni $p < 0,05$).

Figura 8

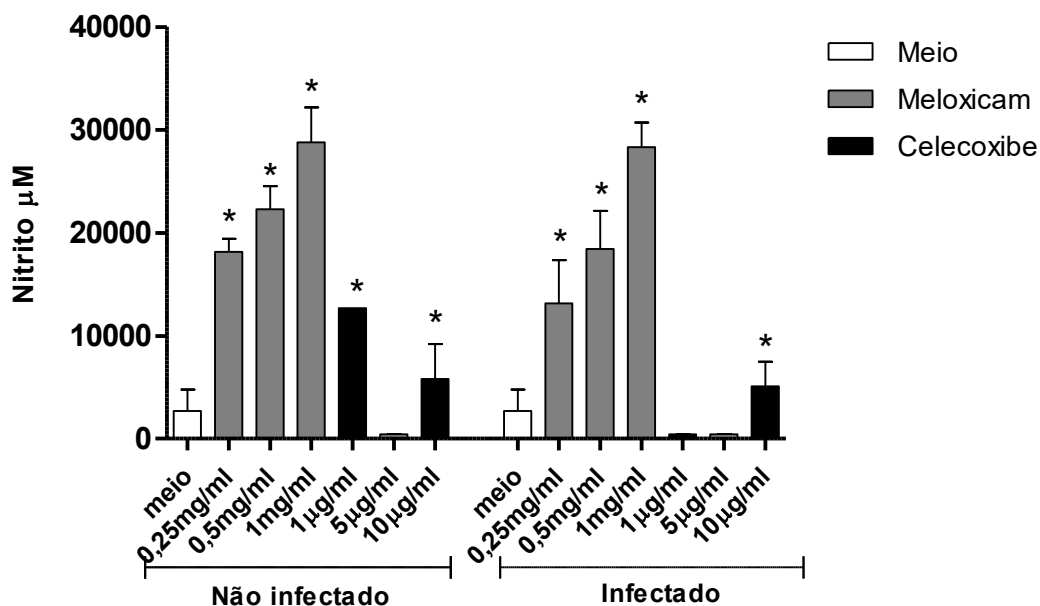


Figura 8: Detecção de nitrito em macrófagos peritoneais de *C. callosus* tratados com concentrações crescentes de inibidores de COX. Macrófagos de *C. callosus* previamente tratados com tioglicolato foram retirados da cavidade peritoneal destes animais, adicionados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 1×10^5 células por poço em 200 μ l de meio RPMI a 10% de soro e, após 24 horas, as células foram infectadas ou não por *T. gondii* (cepa RH) na proporção 3:1 por 3 horas e tratadas ou não com concentrações crescentes de Celecoxibe ou Meloxicam por adicionais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem nitrito por método de Griess. *Comparação entre a produção de nitrito em macrófagos tratados com inibidores de COX e seus respectivos controles (One-Way ANOVA, pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, G.K.; FARIA, G. E. L.; SILVA K. T.; CASTRO, E. C. C.; REIS, M.A., MICHELIN, M.A. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immuno response during the acute phase of experimental infection. **Exp. Parasitol.** v.118, p. 514–521, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.003>
- 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. **Infect. Immun.** United States, v. 72, p. 1397-401, Mar, 2004.
- ACCIOLY, M.T.; PACHECO, P.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; CARROSSINI, N.; ROBBS, B.K.; OLIVEIRA, S.S.; KAUFMANN, C.; MORGADO-DIAZ, J.A.; BOZZA, P.T.; VIOLA, J.P. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. **Cancer Res.** v.15, p.1732-1740,2008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1999>
- ALEXANDER, D.L.; MITAL, J.; WARD, G.E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J.C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathog.** v.1, p.17, 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>
- AMATO, N. V.; MARCHI, C.R. Toxoplasmose. In: Cimerman B & Cimerman S, ed. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2 ed. São Paulo, Atheneu, . p.160-177, 2002.
- ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; CASTRO, A. S.; GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo Trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, England, v. 30, p. 785–791, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.07.002>
- ANYONA, S.B.; KEMPAIAH, P.; RABALLAH, E. Reduced systemic bicycloprostaglandin-E(2) and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia, **Am. J. Hematol.** v.87, p.782–789, 2012. <https://doi.org/10.1002/ajh.23253>
- ARGENZIO, R. A.; RHOADS, J.M. Reactive oxygen metabolites in piglet cryptosporidiosis. **Pediatric Research.** v.41, p.521-526, 1997. <https://doi.org/10.1203/00006450-199704000-00011>
- ARIAS-NEGRETE, S.; KELLER, K.; CHADEE, K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. **Biochem Biophys Res Commun** 208(2): p.582–589, 1995. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1378>
- ASAKRAH, S.; NIEVES, W.; MAHDI, Z.; AGARD, M.; ZEA, A. H.; ROY, C. J.; Post-exposure therapeutic efficacy of COX-2 inhibition against Burkholderia

pseudomallei. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.7,p.2212, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002212>

BANKHURST, A. D. The modulation of human natural killer cell activity by prostaglandins. **J. Clin. Lab. Immunol.** v.7, p.85–91, 1982.

BARBOSA, B.F.; LOPES-MARIA, J.B.; GOMES, A.O.; ANGELONI, M.B.; CASTRO, A.S.; FRANCO, P.S.; FERMINO, M.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; IETTA, F.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biol Reprod.** v.92, n°3, p.:82, 2015.

BARBOSA, B.F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.P.; FERRO, E.A.V. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent on macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta** v.35, p.152-162, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>

BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; FERRO, E. A .V.; NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Vet. Parasitol.**, v. 187, n° 1-2, p. 44-52, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.039>

BARBOSA, B.F., SILVA, D.A., COSTA, I.N.; MINEO, J.R., FERRO, E.V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin Exp Immunol.**, England, v.151, n° 3, p. 536-45, 2008.

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. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.10.011>

BARRETO-DE-SOUSA, V.; PACHECO, G.J.; SILVA, A.R.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; BOZZA, P.T.; SARAIVA, E.M.; BOU-HABIB, D. C. Increased *Leishmania* Replication in HIV-1–Infected Macrophages Is Mediated by Tat Protein through Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Synthesis. **The Journal of Infectious Diseases.** v.194, p.846–854, 2006. <https://doi.org/10.1086/506618>

BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v.135, p.421-432, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arq. Bras. Cardiol.** v.94, n° 4, p.556-63, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>

BEHNKE, M.S.; KAHAN,A.; WOOTTON, J.C.; DUBLEY, J.P.; TANG, K.; SIBLEY, L.D. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.108, p.9631-9636, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015338108>

BELLANTI, J.A.; PUNG, Y.G.; ZELIGS, B.J. Imunologia: In Avery GB, Fletcher M.A. Macdonald MG; Fisiologia e Tratamento do Recém-nascido. 4ª ed Medsi. 46, p.1003-1005,1999.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; MITCHELL, R.A.; MARTIN, S.B.; TRACEY, K.J.; VOELTER, W.; MANOGUE, K.R.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, United States, v. 365, n. 6448, p. 756-9, Oct, 1993. <https://doi.org/10.1038/365756a0>

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

BOZZA, P.T.; MAGALHÃES, K.G.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. **Biochim Biophys Acta**. v.1791, p.540-551, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2009.01.005>

BUENO, L.L., MORAIS, C.G., LACERDA, M.V., FUGIWARA, R.T., BRAGA, E.M. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. **Acta Tropica**. v.123, p. 53– 57, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.02.071>

BUTCHER,B.A.; FOX, B.A.; ROMMEREIM,L.M.; KIM, S.G.; MAURER, K.J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D.R.; BZIK, D.J.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinases ROP16 activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. **PLoS Pathogens**, v.7, p.1-16, 2011.

BUZONI-GATEL, D.; DEBBABI, H.; MENNECHET, F. J.; MARTIN, V.; LEPAGE, A. C.; SCHWARTZMAN, J. D.; KASPER, L. H. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, v. 120, p. 914-924, 2001. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22432a>

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Mol Biol Rev**. 64: p. 607-623,2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>

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

BLOOM, B.R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**, United States, v. 153 (731), p. 80-82, Jul,1966. <https://doi.org/10.1126/science.153.3731.80>

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L.D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Curr Opin Microbiol.**, England, v. 10, n. 6, p. 582-587, Dec., 2007.

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

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; MITCHELL, R.A.; BUCALA, R. The Macrophage Is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage Migration Inhibitory Factor. **J. Exp. Med.**, v.179, p.1895-1902, 1994. <https://doi.org/10.1084/jem.179.6.1895>

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

CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; JANUÁRIO, J. N.; ROMANELLI, R. M. C.; ABREU, M. N. S.; SILVA, F. M.; LOURES, I. R. C.; ANDRADE, J. Q.; CAIAFFA, W. T. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associates with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PlosOne**, v. 9, n° 2, p.e88588, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088588>

CARRUTHERS, V.B.; SHERMAN, G.D.; SIBLEY, L.D. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. **J Biol Chem**, v. 275, p.14346-14353, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14346>

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111-122, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00201-7)

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. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>

CASTRO, A.S.; ALVES, C.M.O.S.; ANGELONI, M.B.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v.34, p.240-247, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.006>

CHSAIVANEEYAKORN, S.; MOORE, J.M.; OTHORO, C.; OTIENO, J.; CHAIYAROJ, S.C.; SHI, Y.P.; NAHLEN, B.L.; LAL, A.A.; UDHAYAKUMAR, V. Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with upregulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **J Infect Dis**, United States, v. 186, n° 9, p. 1371-1375, Nov, 2002. <https://doi.org/10.1086/344322>

CHAVARRIA-SMITH, J.; BOOTHROYD, J. C. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v. 82, n° 1, p. 460-468, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01170-13>

CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J Exp Med.**, United States, v.166, n° 5, p. 1229-44, Nov, 1987.

CHIAPPINO, M. L.; NICHOLS, B. A.; O'CONNOR, G. R. Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. **J. Protozool.** 31: p.288-292, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02963.x>

CILLARI, E.; LIEW, F.Y.; LELCHUK, R. Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v.54, p.386–394,1986

CNEUDE. F.; DELIEGE, R.; BARBIER,C.; DURAND-JOLY, I.; BOURLET, A. S. Toxoplasmose congénitale disséminée responsable d'un choc septique? **Arch Pédiatr.** v.10, p.326-328,2003

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Princípios éticos na experimentação animal, São Paulo, 1991.

COMMODARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; BURNIER JR, M. N.; BELFORT JR, R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 345-350, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200030>

COUVREUR, J.; DESMONTS, G.; TOUMIER, G.; SZUTERKAC, M. Etude d'une série homogène de 210 cas de toxoplasmose congénitale chez des nourissons âgés de 0 a 11 mois et dépistés de façon prospective. **Ann Pédiatr.**v. 31,p.815-819,1984.

DALRYMPLE, S.A.; LUCIAN, .L.A.; SLATTERY, R., MCNEIL, T., AUD, D.M.; FUCHINO, S., LEE, F., MURRAY, R. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2262-2268, 1995

DARDÉ, M.L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocalisation on polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean,v. 39, p. 551-558, 1988. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.551>

DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proc Natl Acad Sci.**,United States, v. 56 (1), p. 72-77, 1966.

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

DENKERS, E.Y.; BUTCHER, B.A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol.** v.1,p.35-41, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.10.004>

DINARELLO, C. A.; NOVICK, D.; PUREN, A. J.; FANTUZZI, G.; SHAPIRO, L.; MUHL, H.; YOON, D. Y.; REZNIKOV, L. L.; KIM, S. H.; RUBINSTEIN, M. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. **J. Leukoc. Biol.**, v. 63, n° 6, p. 658-664, 1998. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.6.658>

DOBROWOLSKI, J.M.; CARRUTHERS, V.B.; Sibley L.D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol.** v.26p.163-173,1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5671913.x>

DUBEY, J.P.; BEATIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press, 1988.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 59, p.505-512, 1973. <https://doi.org/10.2307/3278784>

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. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

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

DUMÈTRE, A.; DUBEY, J. P.; FERGUSON, D. J. P.; BONGRAND, P.; AZAS, N.; PUECH, P. H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **PNAS.**, v. 110, n° 28, p. 11535-11540, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308425110>

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol**, v. 34, p. 793-813, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E. A.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 103-107, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000100018>

FERGUSON, D. J. P. & HUTCHISON, W. M. Comparison of the development of avirulent and virulent strains of *Toxoplasma gondii* in the peritoneal exsudate of mice.

Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 75, n. 5, p. 539-546, 1981. <https://doi.org/10.1080/00034983.1981.11687478>

FERRO, E.A.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D.A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **Am J Pathol.**, United States, v. 172, n° 1, p. 50-8, Jan, 2008.

FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.7089-7094.2002>

FILISSETT, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann. Ist. Super Sanità**, Strasbourg, v. 40, n° 1, p. 71-80, 2004.

FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUJALON, O.; BIDERRE, C.; BRICHE, I.; LOYENS, A.; ODBERG-FERRAGUT, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 83, n. 2, p. 201-210, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02773-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02773-9)

FRANCO, P.S.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; IETTA, F.; SHWAB, E.K.; SU, C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Front Microbiol.** v.10, n° 6, p.181, 2015.

FRANCO, P.S.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v.32, n°11, p.838-44, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.012>

FUJINO, H.; SALVI, S.; REGAN, J. W. Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. **Mol. Pharmacol.** v.68, p. 251-259, 2005.

FLAJNIK, M. F.; DU PASQUIER, L.. "Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?" **Trends in Immunology** 25(12), p. 640-644, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.10.001>

FLEIGE, T.; SOLDATI-FAVRE, D. Targeting the transcriptional and translational machinery of the endosymbiotic organelle in apicomplexans. **Current Drug Targets**, v.9, p.948-956, 2008. <https://doi.org/10.2174/138945008786786073>

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E.P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A.A.; SHENOY, A.S.; TERRAZAS, L.I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A.R.; RODRIGUEZ-SOSA M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.**, United States, v. 16, n° 22, p. 1-11, Jul, 2008.

FRANCO, P. S.; SILVA, D. A. O; COSTA, I. N.; GOMES, A. O.; SILVA, A. L.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E.A V. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. **Placenta**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.012>

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MELLO, F.G.; DOSREIS, G.A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**. 403: p.199-203, 2000. <https://doi.org/10.1038/35003208>

GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. Antiproliferative effect of INF in immuno regulation. INF- inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J.Immunol**. 140: 4245-4231, 1988.

GAO, W.; PEREIRA, M.A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. of Parasitol.**, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00322-8)

GARCÍA-BUENO, B.; LEZA, J.C. Inflammatory/anti-inflammatory mechanisms in the brain following exposure to stress. **Rev Neurol**. v.46, n° 11, p. 675-83, 2008.

GAVRILESCU, L. C.; DENKERS, E. Y. Interleukin-12 p40- and Fas Ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, United States, v. 71, n° 5, p. 2577–2583, May 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2577-2583.2003>

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

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, p. 2533-2543, 1994.

GAZZINELLI, R.T.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J Immunol.**, United States, v.151, n°7, p.3672-3681, Oct, 1993.

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y.; SHER, A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. **Infect. Agents Dis.** 2: p.139-149, 1993.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. **J Immunol.**, 148: 1792-1796, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4 β and CD8 β T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J. Immunol.**, v. 146, p. 286–292, 1991.

GOMES, A. F.; MAGALHÃES, K. G.; RODRIGUES, R.M.; CARVALHO, L.; MOLINARO, R.; BOZZA, P.T.; BARBOSA, H. S. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE $_2$. **Parasit Vectors**.v.7, p. 3305-3347, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-47>

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol** v.178, p.2792-2801, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>

GORFU, G.; CIRELLI, K. M.; MELO, M. B.; MAYER-BARBER, K.; CROWN, D.; KOLLER, B. H.; MASTERS, S.; SHER, A.; LEPPLA, S. H.; MOAYERI, M.; SAEIJ, J. P. J.; GRIGG, M. E. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **MBio.**, v. 5, n $^{\circ}$ 1, p. e01117-01113, 2014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01117-13>

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 26, n $^{\circ}$ 1, p. 131-138,1982. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)

GUEDES, P.M.M., GUTIERREZ, F.R.S., MAIA, F.L., MILANEZI, C.M., SILVA, G.K., PAVANELLI, W.R., SILVA, J.S. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite Induced Myocarditis. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, Feb. 2010.

HATA, A. N.; BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol. Ther.**v.103, p.147–166, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.06.003>

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunology**. v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02154-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02154-8)

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.133, n.3, p.261-278, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000485>

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, v.1, p.41-61, 2005. <https://doi.org/10.1079/AHR2005100>

HOWE, D. K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.1411-1414, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**, v. 172, p. 1561-1566, 1995. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

HUDSON, J.D. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **J. Exp. Med.**, v. 190, n° 10, p. 1367-70, 1999. <https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1375>

HUNTER, C. A.; DAVID SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 766-778, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>

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

INFANTE-DUARTE, C.; HORTON, H.F.; BYRNE, M.C.; KAMRADT, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL17 in Th cells. **J. Immunol.** v.165, p.6107-6115, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6107>

JEBBARI, H.; ROBERTS, C.W.; FERGUSON, D.J.P.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 5, p. 231-239, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x>

JONES, T.C.; HIRSCH, J.G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. **J Exp Med.** v.136, p. 1173-1194,1972. <https://doi.org/10.1084/jem.136.5.1173>

JUNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; WIL CRUVINEL, S.M.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Aspectos moleculares e celulares da imunidade inata. **Rev Bras Reumatol.**,p.552-580, 2010.

JÜTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; RÖLLINGHOFF, M.; BUCALA. R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania*

major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. **J Immunol.** United States, v. 16, n° 5, p. 2383-2390, 1998.

KALINSKI, P.; SCHUITEMAKER, J.H.; HILKENS, C. M.; KAPSENBERG, M. L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. **J. Immunol.** 161, p.2804–2809, 1998.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J. Immunol.** 188, p. 21–28, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>

KAMDA, J.D.; NASH, T.E.; SINGER, S.M. *Giardia duodenalis*: Dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp. Parasitol.*, v. 130, n. 3, p. 288-291, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.003>

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. *Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu*, p. 149-156, 2002.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. *Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu*, p. 149-156, 2005.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.617-621.2005>

KENNEDY, M.K.; MOHLER, K.M.; SHANEBECK, K.D.; BAUM, P.R.; PICHA, K.S.; OTTEN-EVANS, C.A.; JANEWAY, C.A.JR; GRABSTEIN, K. H. Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. **Eur J Immunol.**, Germany, v.24, n.1, p. 116-23, 1994.

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

KIM, J.Y.; AHN, M.H.; SONG, H.O.; CHOI, J.H.; RYU, J.S.; MIN.D.Y.; CHO, M.H. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. **Korean Journal of Parasitol.** v.44, p.197-207, 2006. <https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.3.197>

KIRKBY, N.S.; LUNDBERG, M.H.; HARRINGTON, L.S.; LEADBEATER, P.D.M.; MILNE, G.L.; POTTER, C.M.F.; AI-YAMANI, M.; ADEVEMI, O.; WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.109, n°43, p. 17597–17602, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209192109>

KOEBERNICK, H.; GRODE, L.; DAVID, J.R.; ROHDE, W.; ROLPH, M.S.; MITTRÜCKER, H.W.; KAUFMANN, S.H. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, United States, v. 99, n° 21, p. 13681-13686; Out, 2002.

KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in Interleukin-6-deficiente mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339-342, 1994. <https://doi.org/10.1038/368339a0>

KORN, T.; BETTELL, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 cells. **Annu. Rev. Immunol.** 27, p.485–517, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>

LENG, L.; METZ, C.N.; FANG, Y.; XU, J.; DONNELLY, S.; BAUGH, J.; DELOHERY, T.; CHEN, Y.; MITCHELL, R.A.; BUCALA, R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. **J. Exp. Med.** v.197, p.1467–1476, 2003

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013. <https://doi.org/10.1038/nm.3221>

LUE, H.; KLEEMANN, R.; CALANDRA, T.; ROGER, T.; BERNHAGEN, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes Infect.**, France, v. 4, n° 4, p. 449-60, Apr, 2002.

LUNDE, M. N. & JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 69, n. 5, p. 806-808, 1983. <https://doi.org/10.2307/3281034>

LYCKE, E.; CARLBERG, K.; NORRBY, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. **Infection and Immunity**. v. 11, n. 4, p. 853-861, 1975.

MAILIARD, R. B.; ALBER, S. M.; SHEN, H.; WATKINS, S. C.; KIRKWOOD, J. M.; HERBERMAN, R. B., et al. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. **J. Exp. Med.** 202, p. 941–953, 2005. <https://doi.org/10.1084/jem.20050128>

MAGNO, R.C., LEMGRUBER, L.; VOMMARO, R.C., DE SOUZA, W., ATTIAS, M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. **Microsc. Res. Tech.** v.67, p.45-52, 2005. <https://doi.org/10.1002/jemt.20182>

MAROTTA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the macrophage cell murineline J 774. **Br. J. Pharmacol.** 107, p. 640-641, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb14499.x>

MATTE, C.; MAION, G.; MOURAD, W.; OLIVIERI, M. *Leishmania donovani* induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. **Parasite Immunol** v.23, p.177-184, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00372.x>

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

MELLO, D. A. [*Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia-Cricetidae): its characterization, distribution, biology, breeding and management of a laboratory strain]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 37-44, 1984. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761984000100003>

MEISSNER, M.; REISS, M.; VIEBIG, N.; CARRUTHERS, V. B.; TOURSEL, C.; TOMAVO, S.; AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. **Journal of Cell Science**. v. 115, n. 3, p. 563-574, 2002.

MCCABE, R. E.; LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis, **J Infect. Dis.**, United States, v.150, p. 961-962, Dec, 1984.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; KIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-39, Jan., 2009.

MICHELIN, M.A., SILVA, J.S., CUNHA, F.Q., Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.** v.111, p.71-79, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.05.001>

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

MITCHELL, R.A.; BUCALA, R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Semin Cancer Biol.**, England, v.10, nº 5, p. 359-66, Oct, 2000.

MITCHELL, R.A.; METZ, C.N., PENG, T.; BUCALA, R. Sustained Mitogenactivated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmatic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). **J Biol Chem.**, United States, v. 274, nº 25, Jun, 1999.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, Stanford, v. 363, nº 9425, p. 1965- 1976, Jun, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MOSMANN, T.R. Cytokines: is there biological meaning? **Curr. Opin. Immunol.** p.311-314, 1991. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(91\)90029-Z](https://doi.org/10.1016/0952-7915(91)90029-Z)

MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; PIAO, L. X.; TAKEUCHI, O.; AKIRA. S.; ISHIKURA, H.; YANO, A. TLR-2 as an essential molecule for protective

immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **International Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1081-1087, 2003. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg108>

NANDAKISHORE, R.; YALAVARTHI, P.R.; KIRAN, Y.R.; RAJAPRANATHI, M. Selective cyclooxygenase inhibitors: Current status. **Curr Drug Discov Technol** v.11, n^o, p.127–132, 2014.

NAGAMATSU, T.; SCHUST, D. J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. **Reprod. Sci.** 17, p. 209–218, 2010. <https://doi.org/10.1177/1933719109349962>

NAKAYAMA, T.; MUTSUGA, N.; YAO, L.; TOSATO, G. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. **J. Leukoc. Biol.** 79, p.95–104, 2006. <https://doi.org/10.1189/jlb.0405226>

NEVES, D.P. *Parasitologia Humana. 10 ed., Atheneu; São Paulo.* p. 147-156, 2001

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana. 11^a ed. Atheneu, São Paulo,* p. 147-156, 2005.

NICHOLS. B.A.; O'CONNOR, G.R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. **Lab Invest.** 44: p.324-335, 1981.

OLIVEIRA, J.G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, G.L.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. BeWo Trophoblasts are Unable to Control Replication of *Toxoplasma gondii*, even in the Presence of Exogenous IFN-gamma. **Placenta**, England, v. 27, n^o 6-7, p. 691-698, Jun-Jul, 2006.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 12, p. 1385- 1394, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

PASSOS, S.T.; SILVER, J.S.; O'HARA, A.C.; SEHY, D.; STUMHOFER, J.S.; HUNTER, C.A. IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. **J. Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1776-1783, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901843>

PAWLOWSKI, N.A.; KPALN, G.; HAMIL, A.L.; COHN, Z.A.; SCOTT, W.A. Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures. **J. Exp. Med.** 158: p. 393-412, 1983. <https://doi.org/10.1084/jem.158.2.393>

PEIXOTO, L.; CHEN, F.; HARB, O.S.; DAVIS, P.H.; BEITING, D.P.; BROWNBACK, C.S.; OULOGUEM, D.; ROOS, D.S. Integrative genomics approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. **Cell Host Microbe**, v.8, p.208-218, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.07.004>

PEREIRA MDE, F.; SILVA, D. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia,

Cricetidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-114, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100021>

PERKINS, D.J.; HITNER, J.B.; MWAIKAMBO, E.D. Impaired systemic production of prostaglandin E2 in children with cerebral malaria, **J. Infect. Dis.** v.191, p.1548-1557, 2005. <https://doi.org/10.1086/429332>

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins-mediated suppression of lymphoproliferation and cytokine synthesis during the early phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol** v.193, p.90–98, 1999. <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1463>

PINTO, Luciane D.; DE CARLI, Cristine M.; RODRIGUES, Berenice de A.; Prevalência da toxoplasmose na medicina veterinária e sua importância como zoonose: revisão. **Veterinária em Foco**, v.7, n.1, jul./dez. 2009.

POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; BERTUCCINI, L.; POZIO, E.; DUBEY, J. P.; SPANO, F. Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n° 14, p. 1639-1649, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.009>

RACHINEL, N.; BUZONI-GATEL, D.; DUTTA, C.; MENNECHET, F.J.; LUANGSAY, S.; MINNS, L.A.; GRIGG, M.E.; TOMAVO, S.; BOOTHROYD, J.C.; KASPER, L.H. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*, **J. Immunol.** v.173, p.2725 - 2735, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2725>

REESE, M.L.; ZEINER, G.M.; SAEIJ, J.P.J.; BOOTHROYD, J.C.; BOYLE, J.P. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.9625-9630, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015980108>

REINER, N.E.; MALEMUD, C.J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **Journal of Immunology** v.134, p.556–563, 1985.

REMYNTOON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. **Els Saund, United States of America** 31, p.947-1091, 2006.

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

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **J. Infect.**, v. 68, n° 1, p. S125-133, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.023>

ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 264-296, 2012.

RODRIGUES, A.A.; CLEMENTE, T. M.; SANTOS, M.A.; MACHADO, F.C.; GOMES, R.G.; MOREIRA, H.H.; CRUZ, M.C.; BRÍGIDO, P. C.; SANTOS, P.C.; MARTINS, F.A.; BAHIA, D.; MARICATO, J.T.; JANINJ, L.M., REBOREDO, E.H.; MORTARA, R.A. SILVA, C.V. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi*P21 enhances phagocytosis. **PLoS One**, v.7, n°12, p.e.51384 2012.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONIATTI, C.; PUC CETII, P.; BISTONI, F.; POLI, V. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J. Exp. Med.*, v. 183, n. 4, p. 1345-1355, Apr., 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1345>

SAEIJ, J. P.; COLLER, S.; BOYLE, J. P.; JEROME, M. E.; WHITE, M. W.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**. v. 445, n. 7125, p. 324-327, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05395>

SAEIJ, J.P.J.; BOYLE, J.P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L.D.; BROOKEPOWELL, E.T.; AJIOKA, J.W.; BOOTHROYD, J.C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v.314, p.1780-2783, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1133690>

SAEIJ, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 477-481, Oct., 2005.

SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P.; LEVY, A. M.; PRADO, J. C., JR. *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in *Calomys callosus* a natural reservoir of infection. **Exp Parasitol**, v. 119, p. 197-201, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.011>

SCANGA, C.A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E.Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal Immunology*, v.168, n.12, p.5997-6001, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.5997>

SHARMA, P.; CHITNIS, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, p. 432-437, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.004>

SHORT, S.S.; WANG, J.; CASTLE, S.L.; FERNANDEZ, G.E.; SMILEY, N.; ZOBEL, M.; PONTARELLI, E.M.; PAPIILLON, S.C.; GRISHIN, A.V.; FORD, H.R. Low doses of celecoxib attenuate gut barrier failure during experimental peritonitis. **Lab Invest**. v.93, n° 12, p.1265-1275, 2013. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.119>

SIACHOQUE, H.; GUZMAN, F.; BURGOS, J.; PATARROYO, M. E.; GOMEZ MARIN, J. E. *Toxoplasma gondii*: immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 62-65, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.02.005>

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**. v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>

SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; FUKUTOM, Y.; KRAHENBUHL, J.L. Tumor Necrosis Factor α triggers antitocoplasmal activity of IFN γ primed macrophages. **J.Immunol.**, United States, v. 147, n $^{\circ}$ 7, p. 2340-2345, Oct, 1991.

SINGH, S.; ALAM, M.M.; PAL-BHOWMICK, I.; BRZOSTOWSKI, J.A.; CHITNIS, C.E. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. **PLoS Pathogens**, v.6, p.1000740-1000746, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000746>

SILVA, G. K.; COSTA, R. S.; SILVEIRA, T. N.; CAETANO, B. C. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 β response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, vol. 191, p. 3373–3383, 2013.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood–brain barrier permeability. **Exp. Parasitol.**, v. 26, n $^{\circ}$ 2, p. 167-177, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.019>

SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host- parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res.**, São Paulo, v. 105, n $^{\circ}$ 4, p. 893-898. Oct, 2009.

SILVA-SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **J. Trop. Pediatric.**, v. 50, n $^{\circ}$ 1, p. 50-53, 2004. <https://doi.org/10.1093/tropej/50.1.50>

SINAI, A.P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Subcell Biochem**. v.47, p. 155-164, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_12

SONG, D. H.; LE, J. O. Sensing of microbial molecular patterns by toll-like receptors. **Immunol. Rev.**, v. 250, n $^{\circ}$ 1, p. 216-229, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01167.x>

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Sci Med.**, Porto Alegre, v.20, n. 1, p. 131–143, 2010.

STEFANELLI, P.; TELONI, R.; CARANNANTE, A.; MARIOTTI, S.; NISINI, R.; GAGLIARDI, M. C. Neisseria gonorrhoeae triggers the PGE2/IL- 23 pathway and

promotes IL-17 production by human memory T cells. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 99, p.24–29, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.04.002>

STERIN BORDA, L.; GORELIK, G.; GOREN, N.; CAPPÀ, S.G.; CELENTANO, A. M.; BORDA, E. Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin Immunol Immunopat.** V. 81, n. 2, p. 122-128, 1996. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0167>

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M.E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A.H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiol.**, Amsterdam, v. 217, n. 1, p. 28-36, Jan., 2012.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Washington, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, Apr., 2012.

SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; HONDA, A.; HAYASHI, Y.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A., et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. **J. Biol. Chem.** 267, p.6463–6466, 1992.

SUZUKI, Y.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J. S. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of *Toxoplasma encephalitis* in mice. **J. Immunol.**, v. 6, p. 2045-2050, 1989.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D.; REMINGTON, J.S. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, United States, v.240, p.516-518, Apr, 1988.

TAUCHI-SATO K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition, **J Biol Chem.** v.277, p.44507-44512, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207712200>

TAKENAWA, T.; ISHIYA, J.; NAGAI, Y. Inhibitory effect of prostaglandin E2, forskolin and dibutyryl camp on arachidonic acid release and inositol phospholipid metabolism in guinea pig neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 261: p.1092-1098, 1986.

TALPAIN, E.; AMSTRONG, R. A.; COLEMAN, R. A.; VARDEY, C. J. Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils. **Br. J. Pharmacol.** 114, p.1459–1465, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13370.x>

TANIWAKI, N. N.; GONCALVES, V. M.; ROMERO, J. K.; DA SILVA, C. V.; DA SILVA, S.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi* strains in the *Calomys callosus*: parasitemia and reaction of intracellular forms with stage-specific antibodies in the acute and chronic phase of infection and after immunosuppression. **Parasitol Res**, v. 109, p. 431-440, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2273-z>

TATAKIHARA, V. L. H.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v.52, p.47-58, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00340.x>

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; BEATTY, W. L.; HAJJ, H. E.; JEROME, M.; BEHNKE, M. S.; WHITE, M.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**. v. 314, n. 5806, p. 1776-1780, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1133643>

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase independent actions of cyclooxygenase inhibitors. **FASEB J.**; v.15, p.2057–2072, 2001. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0390rev>

TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, Bunteweg, v. 30, n° 12-13, p. 1217-1258, Nov., 2000.

TOELLNER, K.M.; LUTHER, S.A.; SZE, D.M.; CHOY, R.K.; TAYLOR, D.R.; MACLENNAN, I.C. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce. **J. Exp. Med.** 187, p.1193-1204, 1998. <https://doi.org/10.1084/jem.187.8.1193>

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 558-561, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunol Today**. 14,p.335-338, 1993. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90230-I](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90230-I)

TSATSANIS, C.; ANDROULIDAKI, A.; VENIHAKI, M.; MARGIORIS, A.N. Signaling networks regulating cyclooxygenase-2. **Int J Biochem Cell Biol**38: p. 1654-1661, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.021>

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R., JR.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am J Ophthalmol**, v. 139, p. 350-351, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2004.07.040>

VILCEK, J.; LE, J. *The Cytokine Handbook*, 2° ed. A. Thomson, London: Academic Press, p.1-20, 1994.

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDÈ, M.; PINON, J.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 160–162, Apr., 2004.

WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B. S.; DREW, M. E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell MolLife Sci**, v. 71, p. 1245-1263, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1491-1>

WALKER, W.; ROTONDO, D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. **Immunology** 111, p. 298–305, 2004.

YAP, G.S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J Exp Med**. United States, v.189, n° 7, p.1083-1092, Apr, 1999.

YAROVINSKY, F.; SHER, A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 715-724, Jun., 2011.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J.F.; BANNENBERG, G.L.; SERHAN, C.N.; HAYDEN, M.S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F.S.; FLAVELL, R.A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profiling like protein. **Science**, v. 308, n.5728, p. 1626-1629, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1109893>

YONG, E.C.; CHI, E.Y.; HENDERSON Jr., W.R. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced anti-toxoplasma activity. **Journal of Experimental Medicine** v.180, p.1637–1648, 1994. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1637>

ZASLONA, Z.; SEREZANI, C. H.; OKUNISHI, K.; ARONOFF, D. M.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 restrains macrophage maturation via E prostanoic acid receptor 2/protein kinase A signaling. **Blood**, v.119, p.2358-2367, 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374207>

ZEHMER, J.K.; HUANG, Y.; PENG, G.; PU, J.; ANDERSON, R.G.; LIU, P. A role for lipid droplets in intermembrane lipid traffic. **Proteomics**. v.9, p.914-921, 2009. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800584>

ZWEYTICK, D.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. **Biochem. Biophys. Acta**. v.1469, p.101-120, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00294-7)