

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação da influência dos mastócitos uterinos e de células de glicogênio na zona
juncional de placenta de camundongos BALB/c e C57BL/6 gestantes em modelo de
infecção congênita por *Toxoplasma gondii*

Romulo Oliveira de Sousa

Janeiro de 2018

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação da influência dos mastócitos uterinos e de células de glicogênio na zona
juncional de placenta de camundongos BALB/c e C57BL/6 gestantes em modelo de
infecção congênita por *Toxoplasma gondii*

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

Romulo Oliveira de Sousa

Orientadora: Dr^a Neide Maria da Silva

Uberlândia
Janeiro de 2018

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

S725a
2018

Sousa, Romulo Oliveira de, 1978

Avaliação da influência dos mastócitos uterinos na interface materno-fetal de camundongos BALB/c e C57BL/6 gestantes em modelo de infecção congênita por *Toxoplasma gondii* [recurso eletrônico] / Romulo Oliveira de Sousa. - 2018.

Orientadora: Neide Maria da Silva.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1252>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Toxoplasmose congênita. 3. *Toxoplasma gondii*. 4. Mastócitos. I. Silva, Neide Maria da, 1961, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



Romulo Oliveira de Sousa

“Avaliação da influência dos mastócitos uterinos e de células de glicogênio na zona juncional de placenta de camundongos BALB/c e C57BL/6 gestantes em modelo de infecção congênita por *Toxoplasma gondii*”

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de janeiro de 2018.

Poliana de Castro Melo
Profa. Dra. Poliana de Castro Melo
DCAA/UESC

Fernando R. Carvalho
Prof. Dr. Fernando dos Reis de Carvalho
IFG

Eloisa Amália Vieira Ferro
Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro
ICBIM/UFU

Tiago Wilson Patriarca Mineo
Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo
ICBIM/UFU

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

Dedicatória

Aos meus pais por todo apoio, amor e incentivo incondicionais que deram a mim e aos meus irmãos. Por terem me chamado à atenção nas horas certas, me transformando na pessoa que sou hoje;

À minha esposa Layane Alencar, mãe de meus amados filhos Mateus e Felipe por me incentivar sempre a me tornar uma pessoa melhor, por seu amor e companheirismo que me fazem sempre caminhar na direção certa;

Aos meus irmãos e irmãs Fábio e Mara, Tiago e Mariana por torcerem por mim sempre;

Aos meus amados sobrinhos Pedro, José Otávio, Manuela e Miguel;

À minha “mãe” Luísa Alencar e ao meu sogro Francisco que me têm como filho.

Agradecimentos

A Deus por ter me guiado pelos caminhos certos

À Prof^a Neide por me orientar e me ensinar o trabalho científico com seriedade e responsabilidade e por confiar em mim;

À minha família que sempre torce por mim e também faz parte desta conquista;

À Prof^a Letícia Filice por ter me ajudado com este projeto;

À técnica Ana Cláudia Pajuaba pelos auxílios nos experimentos;

Aos colegas de laboratório Layane, Ester, Marisol, Natália, Mário, Mariele, Ângelo, Carlos, Loyane por me ajudarem nos diversos experimentos realizados ao longo desse trabalho, muito obrigado;

À Yusmaris que é uma pessoa incrível e que tem me ajudado. Obrigado Yus, por tudo;

Aos queridos e queridas tia Luzia, Jair, Loló, Vinicius e Sofia por terem nos acolhido como parte de sua família, vocês são pessoas especiais;

Aos técnicos da histologia Fabrício, Juscélia, Mariani, Rosiane, Ester e Ana que me ajudaram muito desde o início;

As secretárias do PPIPA Lucileide e Lucélia que sempre me auxiliaram da melhor forma possível, meu muito obrigado;

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Sumário

Introdução.....	14
1. Gestação	14
1.1 Interface Materno Fetal.....	16
1.2 Mastócitos	20
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	22
2.1 Ciclo de vida – <i>T. gondii</i>	23
2.2 Toxoplasmose congênita	25
3. Justificativa	26
4. Objetivo Geral	26
4.1 Objetivos Específicos.....	27
5. Materiais e Métodos	29
5.1 Animais de Experimentação.....	29
5.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	29
5.3 Organismos Infecciosos.....	29
5.4 Acasalamento e Detecção de gestação	30
5.5 Infecção Experimental, Coleta e Processamento do Material.....	30
5.6. Análises Histológicas	31
5.7 Detecção de Mastócitos uterinos por Azul de Toluidina.....	32
5.8 Quantificação de células de glicogênio	32
5.9 Análise do peso dos fetos.....	33
5.10 Imunohistoquímica para Detecção de Parasitos.....	33
5.11 Ensaio de detecção de citocinas por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	34
5.12 Extração de RNA mensageiro e obtenção do DNA complementar.....	35
5.12.1 Quantificação das mensagens de <i>eNOS</i> , <i>mcpt4</i> , <i>mcpt5</i> e <i>igf2</i> por reação de PCR quantitativa (qPCR).....	36
5.13 Preparo do antígeno solúvel de taquizoítas (STAg)	37
5.14 Detecção de anticorpos IgA específicos anti- <i>T. gondii</i>	37
5.15 Análise estatística	38
6. Resultados	39
6.1 A infecção por <i>T. gondii</i> no início da gestação afeta o desenvolvimento embrionário de camundongos BALB/c e C57BL/6	39
6.2 Resultados negativos da gestação durante a infecção por <i>T. gondii</i> estão associados ao aumento de TNF e IL-6 sistêmicos e no local da interface materno fetal principalmente em camundongos C57BL/6.....	41
6.3 Mastócitos uterinos aumentam em número em camundongos C57BL/6 quando infectadas por <i>T. gondii</i>	47

6.4 Células de glicogênio estão aumentadas na placenta de camundongos C57BL/6 infectados por <i>T. gondii</i>.....	49
6.5 Produção de IgA anti-<i>T. gondii</i> não aumenta em camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 infectadas pelo parasito	51
6.6 A expressão de <i>igf-2</i> é aumentada em camundongos C57BL/6 após a infecção por <i>T. gondii</i> no final da gestação.....	53
6.7 A infecção por <i>T. gondii</i> diminui o peso dos fetos em camundongos BALB/c, mas não em camundongos C57BL/6.....	55
7. Discussão	57
8. Conclusão	66
Referências	67
Anexos	78

Lista de Abreviaturas

- ABC – Complexo Avidina-Biotina
APC - células apresentadoras de antígeno
AS – artérias espiraladas
CCL – ligante de quimiocinas
CD – Grupo de diferenciação
CEACAM – molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembriogênico
DAB - Diaminobenzidina
dg- Dias de gestação
di – Dias de infecção
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
DP - Desvio padrão
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
eNOS - Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
GLUT – transportador de glicose
GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia-Granulócito-Macrófago
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
 H_2SO_4 – Ácido Sulfúrico
HE - Hematoxilina-Eosina
IE - Índice ELISA
IFN- γ - Interferon- γ
Ig - Imunoglobulina
IGF – fator de crescimento tipo insulina
IGR – Genes induzidos por Interferon
IL – Interleucina
iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível
IURG – restrição de crescimento intrauterino
LAP – peptídeo de latência
LIF – Fator de inibição de leucemia
MCP-1 (CCL2) – Proteína quimiotática para monócito 1
MCPT – protease de mastócitos

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
ng – Não gestante
ni – Não infectada
OPD - O-fenilenodiamina
PAS – ácido periódico de Schiff
PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T - Solução salina tamponada com fosfato-Tween
PBS-TM - Solução salina tamponada com fosfato-Tween-Molico
PCR – Reação de cadeia da polimerase
PSG – proteínas gestação específicas
SNAT – transportador de aminoácidos
TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento β
Th – Células T helper
TLR – receptor tipo *Toll*
TNF α – Fator de necrose Tumoral alfa
Treg - Células T reguladoras
uMC – Mastócitos uterinos
uNK – Células Natural Killer uterinas

Resumo

O marco da gestação é o remodelamento das artérias espiraladas para que haja uma bem-sucedida nutrição por parte da mãe para o feto e os mastócitos uterinos contribuem para esse remodelamento. Vários fatores podem contribuir para que haja uma restrição desse suprimento energético, entre eles doenças congênitas como a toxoplasmose. A infecção por *Toxoplasma gondii* induz um perfil de resposta tipo Th1 que é associada aos resultados prejudiciais da gestação. Para investigar a influência da toxoplasmose congênita na interface materno fetal, fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c foram oralmente infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 no primeiro ou décimo quarto dia de gestação e sacrificadas aos 8 ou 19 dias, respectivamente, após a infecção. Não foram encontrados parasitos no útero/placenta em nenhuma das linhagens, independentemente do tempo de infecção e não houve produção de IgA nas amostras analisadas de soro e homogenato de útero/placenta. A infecção nas fêmeas C57BL/6 não-gestantes provocou aumento na migração de mastócitos para o útero enquanto que a gestação diminui tal migração. Além disso, camundongos C57BL/6 apresentaram altos níveis sistêmicos de TNF e IL-6 comparados aos BALB/c gestantes e não-gestantes. Ainda, no útero/placenta das fêmeas C57BL/6 a infecção aumentou a quantidade de células de glicogênio terço final da gestação. Em conclusão, nós encontramos que a infecção com *T. gondii* durante o início da gestação leva a um aumento dos níveis sistêmicos e locais na interface materno fetal de TNF e IL-6 em camundongos C57BL/6. Essas citocinas pró-inflamatórias induzem a um excessivo recrutamento de mastócitos ao útero que resulta em prejuízo ao embrião e causa hemorragia, necrose e reabsorção. O aumento de células de glicogênio na placenta de camundongos C57BL/6 parece contribuir para o desenvolvimento normal dos fetos dessa linhagem de camundongos.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita, mastócitos, inflamação, TNF, IL-6, células de glicogênio, IURG.

Abstract

The spiral arteries remodeling is the hallmark of gestation to successful nutrition from mother to fetus and uterine mast cells contribute to this remodeling. Several factors may contribute to a restriction of this energy supply, including congenital diseases such as toxoplasmosis. *Toxoplasma gondii* infection induces a Th1 response profile that is associated with detrimental results from gestation. To investigate the influence of congenital toxoplasmosis on the maternal fetal interface, C57BL/6 and BALB/c mice were orally infected with 5 cysts of the ME-49 strain on 1° or 14° day of gestation and sacrificed at 8° or 19° days after infection, respectively. No parasites were found in uterus/placenta. Regardless to infection time and there was no IgA production in the analyzed samples of serum and uterine/placental homogenate. Infection in non-pregnant C57BL/6 females caused a migration increase of mast cells to the uterus whereas gestation decreases the migration. In addition, C57BL/6 mice had high systemic levels of TNF and IL-6 compared to pregnant and non-pregnant BALB/c mice. In addition, in the uterus/placenta of the C57BL/6 females infection increased the amount of glycogen cells at end gestation. In conclusion, we found that infection with *T. gondii* during early gestation leads to increase in systemic and local TNF and IL-6 levels at maternal fetal interface in C57BL/6 mice. These proinflammatory cytokines induce excessive recruitment of mast cells into the uterus, which results in damage to the embryo and cause hemorrhage, necrosis and reabsorption. The increase of glycogen cells in the placenta of C57BL/6 mice seems to contribute to the normal development of fetuses of this strain of mice.

Keywords: Congenital toxoplasmosis, mast cells, inflammation, TNF, IL-6, glycogen cells, IURG.

Introdução

1. Gestação

Através da evolução, os animais têm desenvolvido mecanismos os quais os protegem contra parasitas e infecções através da detecção e destruição de material biológico estranho presente em seu organismo (SCHJENKEN; TOLOSA, 2012). Estes mecanismos que visam eliminar抗ígenos não próprios e preservar a integridade dos抗ígenos próprios têm se desenvolvido por milhares de anos em um complexo sistema, o sistema imune (BAINBRIDGE, 2000). Porém, existem circunstâncias que requerem um reajuste desse balanço, como é o caso da gestação, onde o sistema imune enfrenta um dilema: proteger a mãe contra infecções e ao mesmo tempo aceitar o feto semi-alogênico (CHATTERJEE *et al.*, 2014). Em estudo recente foi descrito, através da análise por espectrometria de massas em amostras de sangue periférico, uma delicada adaptação do sistema imune de gestantes ao longo da gravidez (AGHAEPOUR *et al.*, 2017). Células T *helper* 17 (Th 17) e T reguladoras (Treg) fazem parte desse sistema que, quando saudável, não apenas reconhece e elimina infecções como também regula uma indesejável resposta contra抗ígenos próprios ou contra organismos inofensivos. Para isso é necessário um fino balanço entre a rede de moléculas e células que fazem parte da resposta imune. Para proteger o embrião de danos à respostas inflamatórias e citotóxicas, um estado de tolerância imune deve ser gerado (ROBERTSON *et al.*, 2013). Em humanos tem sido demonstrado um aumento no número das células Tregs circulantes durante o início da gestação sendo no segundo semestre o pico do aumento do número dessas células acompanhada da queda após o parto. Esses eventos ocorrem simultaneamente ao aumento da invasão de trofoblastos na decídua (SOMERSET *et al.*, 2004). Em modelo animal foi observado um aumento do número de células Tregs no sangue periférico com

uma simultânea proliferação dessas células nos linfonodos inguinais, mesentéricos e ilíacos sugerindo a importância dessas células na regulação imune na gestação (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004). A decídua é uma especialização do endométrio durante a gestação e duas populações de células residentes nesse local com uma função altamente reguladora são os macrófagos deciduais e linfócitos Tregs, os quais realizam uma importante função no estabelecimento da tolerância e da manutenção da homeostasia que é crucial para o desenvolvimento do feto (ERNERUDH; BERG; MJÖSBERG, 2011; SVENSSON-ARVELUND; ERNERUDH, 2015). Os macrófagos deciduais são as células apresentadoras de抗ígenos (*Antigen Presenting Cells*) mais abundantes durante a gestação e têm um papel central na regulação do balanço entre tolerância e resposta inflamatória (BARTMANN *et al.*, 2014). Essas células têm características similares aos macrófagos M2 em humanos como a expressão de receptores CD 163, 206 e 209 bem como a produção de citocinas e quimiocinas como interleucina (IL)-10, *motif* de ligante de quimiocinas (CCL)-2 e CCL-18 (LIDSTRÖM C., 2003; SVENSSON *et al.*, 2011).

Células T *helper* (Th) 1 são caracterizadas por produzirem IFN- γ e TNF e estão envolvidas na imunidade celular, enquanto que células do perfil Th2, que são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10, estão envolvidas na imunidade humoral (MOSMANN *et al.*, 1986). Posteriormente foi descrita uma outra subpopulação de células T produtoras de IL-17 e que estavam associadas a doenças autoimunes, conhecidas como Th17 (HARRINGTON *et al.*, 2005). Porém, uma outra subpopulação de células T, as T reguladoras (Tregs), caracterizadas por apresentarem marcadores de membrana CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, suprimem a geração e função efetora de células inflamatórias Th1 e Th17 (SAKAGUCHI, 2004).

Além disso, outros mecanismos de regulação da resposta imune têm sido associados à liberação de TGF-β, como por exemplo, as glicoproteínas gestação-específicas (PSG). As PSG são produzidas durante a gestação por citotrofoblastos e sinciotrofoblastos e são expressas por genes *psg* e representam uma família de pelo menos 30 isotipos. Possuem efeito pleiotrópico e estão envolvidas desde a implantação, placentação e controle da homeostase e formação vascular (MOORE; DVEKSLER, 2014). Muitas células secretam pelo menos uma isoforma de TGF-β (TGF-β1, -2, -3) na forma latente (ANNES, 2003) e a interação de TGF-β madura com a isoforma específica associada ao peptídeo de latência (LAP) bloqueia essa isoforma madura com o seu receptor e, portanto, a ativação de TGF-β latente, necessitando de um agente que quebre essa associação com LAP para a formação da isoforma ativa. Essa ativação ocorre pela quebra ou pela alteração conformacional (BLOIS *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2011). Blois e colaboradores demonstraram em uma abordagem experimental em modelo livre de célula que PSG-1 é capaz de ativar a isoforma 1 de TGF-β e sugerem ainda a ativação também de TGF-β 2 (BLOIS *et al.*, 2014). Os genes *PSGs* e das moléculas de adesão celular relacionadas ao antígeno Carcinoembriogênico (CEACAM - *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) são membros da superfamília de imunoglobulinas (IgSF) (KAMMERER; ZIMMERMANN, 2010).

1.1 Interface Materno Fetal

A placenta humana é composta de células fetais e maternas e é caracterizada por uma íntima associação entre trofoblastos fetais e tecidos maternos. Em humanos e em outros organismos eutérios, a interface materno-fetal consiste em células trofoblásticas

progenitoras de origem fetal, as quais se diferenciam em citotrofoblastos (CTBs) e têm capacidade proliferativa, e sinciciotrofoblastos, que por sua vez são células diferenciadas e multinucleadas (ARORA *et al.*, 2017). Em alguns animais, incluindo roedores e primatas, a implantação ocorre logo após o blastocisto se liberar da zona pelúcida (dia 4,5 de desenvolvimento em camundongos) (CROSS; WERB; FISHER, 1994). Em humanos, a placenta começa a se formar dentro da primeira semana de gestação quando blastocistos, recobertos por uma camada de trofoblastos, começam a se ancorar no endométrio materno. A partir de 10-12 semanas de gestação a circulação materna sofre um remodelamento através da formação das artérias espiraladas e a placenta humana se torna hemocorial que indica um contato próximo entre os sangues materno e fetal (ARORA *et al.*, 2017). A característica principal dos mamíferos eutérios é a dependência da placenta para a nutrição intrauterina e esse tipo de placenta é do mais invasivo pois estão em contato o tecido fetal (trofoblastos), o sistema imune da mãe e a placenta fetal (MEEUSEN; BISCHOF; LEE, 2001). Os blastocistos, após vários eventos morfogenéticos, sofrem a implantação na decídua e, consequentemente, os trofoblastos oriundos do blastocisto iniciam a migração em direção às artérias espiraladas (*Spiral Arteries*). Os blastocistos murinos compartilham uma arquitetura muito próxima com humanos e coelhos (MAÎTRE, 2017).

O marco na gestação é o remodelamento as artérias espiraladas para se adaptar à crescente demanda de nutrientes e oxigênio do feto em desenvolvimento. Durante o remodelamento das SAs, paredes grossas necessitam ser transformadas em vasos com paredes mais finas para poder suprir a mudança na demanda de sangue para a unidade feto/placenta (MDL, 1975). Através da mudança na forma das SAs, a circulação do sangue pode aumentar em dez vezes o seu volume e a velocidade do fluxo sanguíneo materno para o espaço interviloso é reduzido (PIJNENBORG; VERCROYSE;

HANSSENS, 2006). Isto é importante para uma troca de nutrientes, oxigênio e produtos de descarte perfeitamente regulada e, portanto, para o desenvolvimento fetal (HUPPERTZ *et al.*, 2009). Neissel e colaboradores sugerem o óxido nítrico (NO) como um potente vasodilatador liberado pelas células endoteliais que pode contribuir para o fenômeno de diminuição da resistência vascular no útero (NASIELL *et al.*, 1998) e um recente estudo com animais C57BL/6J eNOS^{-/-} mostra a importância da eNOS tanto da mãe quanto do feto para o aumento do fluxo sanguíneo intrauterino durante a gestação (KULANDAVELU *et al.*, 2012).

O estabelecimento do gradiente de oxigênio durante o desenvolvimento da placenta determina a ação dos trofoblastos, se migram ou proliferam (ARORA *et al.*, 2017). Uma perfusão apropriada neste espaço é necessária para uma correta função endócrina e de troca, ambas para sustentar o crescimento normal e desenvolvimento do embrião e do feto, e também, para sustentar as mudanças normais relacionadas à gestação no sistema fisiológico materno. Evidências genéticas em camundongos tem mostrado que células *Natural Killer* uterinas (uNK) regulam pelo menos parte da vasodilatação que ocorre durante a gestação para aumentar o fluxo sanguíneo para o sítio de implantação (ADAMSON *et al.*, 2002).

A regulação feita pela placenta ocorre na medida em que o peso saudável para o nascimento é alcançado. Glicose e aminoácidos são os primeiros substratos energéticos necessários para o desenvolvimento da placenta e do feto e a sua menor disponibilidade resulta no crescimento fetal reduzido e baixo peso ao nascimento (WU; IMHOFF-KUNSCH; GIRARD, 2012). A saúde e o *status* nutricional da mãe podem influenciar a disponibilidade desses nutrientes e, portanto, impactar no desenvolvimento do feto (BRETT *et al.*, 2014). Este impedimento frequentemente se manifesta como uma invasão de trofoblastos menos eficaz e um pobre remodelamento das artérias espiraladas, ou

reduzida vascularização e expansão dos vilos. Isto pode causar uma menor perfusão placentária ou uma reduzida área de troca de substratos, respectivamente, e esta interrupção pode reduzir a quantidade de glicose e aminoácidos para o feto, causando restrição no crescimento (BELL; EHRHARDT, 2002).

Fatores de crescimento tipo insulina (IGFs em inglês), IGF-1 e IGF-2, são polipeptídios que promovem crescimento fetal e neonatal, agindo em resposta à sinais fetais, maternos e placentários tais como nutrientes, oxigênio e hormônios via receptores IGF-1R e IGF-2R, e o receptor de insulina. IGF-2 é o mais abundante dos dois, entretanto, a deleção de qualquer um dos genes resulta em reduzido peso ao nascimento (FOWDEN *et al.*, 2008). IGF-1 regula o crescimento fetal em resposta à disponibilidade de nutrientes enquanto que IGF-2 estimula o crescimento e diferenciação placentária (SFERRUZZI-PERRI *et al.*, 2011). Além do mais, IGFs regulam transporte de substrato e secreção de hormônio e influenciam o crescimento fetal indiretamente por influenciar a disponibilidade materno de substrato ou diretamente por influenciar a absorção e transporte placentário de nutrientes (SFERRUZZI-PERRI *et al.*, 2011). Em trofoblastos humanos, IGF-1 e 2 estimulam a absorção de glicose e aminoácidos (ROOS *et al.*, 2009). Interessantemente, em modelo nocaute, a deleção da transcrição do gene *igf2* específico para placenta resulta na redução do crescimento da placenta enquanto o crescimento fetal é mantido associado à regulação positiva do transportador de glicose (GLUT3) e transportador de aminoácido (SNAT2) durante o terço médio da gestação, entretanto a restrição de crescimento intrauterino - IURG (*Intrauterine Growth Restriction*) ainda se desenvolve próximo ao parto (CONSTANCIA *et al.*, 2005; CONSTÂNCIA *et al.*, 2002; SIBLEY *et al.*, 2004).

O desenvolvimento saudável da placenta não depende apenas da invasão e ancoragem dos trofoblastos fetais, mas também da presença de células imunes como as

células NK e macrófagos. A mudança do tipo de resposta imune durante a gestação é de grande importância principalmente em espécies onde há a formação da placenta hemocorial como em humanos e roedores (FAAS; DE VOS, 2017). Células NK são uma das maiores populações de leucócitos na decídua e o seu número continua em crescimento até o fim do primeiro trimestre e diminui próximo ao parto. Células NK deciduais contribuem para o aumento do fluxo sanguíneo na interface materno fetal e auxiliam a migração de trofoblastos. Seu principal papel durante a gestação é a secreção de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e angiopoetina-2, além de citocinas e fatores de crescimento como TNF- α , IL-10, GM-CSF, fator de crescimento placentário, IL-1 β , TGF- β 1, CSF-1, LIF e IFN- γ (LEE; LEE; LEE, 2011).

1.2 Mastócitos

Uma dessas células que contribuem para a regulação imune na gestação é o mastócito (MC) que é tecido-residente, granulada, presente em praticamente todos os tecidos e participa da resposta imune inata e adaptativa (BULFONE-PAUS; BAHRI, 2015). Essas células são originadas de precursores hematopoiéticos que migram e realizam o estágio final de diferenciação e maturação nos tecidos em que irão residir (KITAMURA, 1989). Os mastócitos residentes no tecido endometrial e útero exibem sinais de ativação durante a fase pré-menstrual (SIVRIDIS *et al.*, 2001). Os grânulos de MCs possuem uma gama de mediadores pré-formados, incluindo, prostaglandinas, leucotrienos e várias citocinas e proteases, histamina, serotonina (em roedores), heparina e/ou condroitin sulfato, triptase, quimase, proteína básica principal, catepsina, carboxipeptidase-A (GALLI; NAKAE; TSAI, 2005). A histamina produzida e liberada por MCs tem sido associada na implantação do blastocisto e desenvolvimento da placenta

por contribuir e promover a invasão, crescimento e expressão de moléculas de adesão dos trofoblastos (SZEWCZYK *et al.*, 2006; SZUKIEWICZ *et al.*, 1999). Os roedores expressam uma variedade de genes para as β -quimases, designados de protease 1 de mastócitos (mMCPT-1), mMCPT-2 e mMCPT-4, bem como para uma α -quimase, mMCPT-5 (SCANDIUZZI *et al.*, 2010).

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

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

O sistema imune também possui um importante papel na regulação da angiogênese. Ribatti e colaboradores demonstraram que mastócitos podem induzir crescimento vascular e citocinas específicas liberadas por leucócitos tem sido identificadas como fatores pró-angiogênicos (RIBATTI *et al.*, 2001). Alguns estudos têm mostrado a importância dos mastócitos durante a infecção por *Toxoplasma gondii* (FERREIRA *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2013).

Os mastócitos são abundantes na mucosa intestinal e animais Knockout para mastócitos e infectados por via oral por *T. gondii* apresentam reduzida resistência contra o parasito por terem diminuída a capacidade de liberar IFN- γ (CRUZ *et al.*, 2014).

2. *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório que pertence ao filo apicomplexa, que é capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros e penetrar de forma ativa em uma enorme gama de células nucleadas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Apresenta três estágios distintos: esporozoítos em oocistos, taquizoítos e bradizoítos (HAMPTON, 2015). Em humanos e em outros hospedeiros intermediários, o parasito existe sob duas formas - taquizoítos e bradizoítos. A primeira forma do parasito é caracterizada pela rápida replicação dentro das células do hospedeiro podendo causar a doença. Enquanto que pelo uso de drogas ou por pressão do sistema imune, o parasito pode ser controlado, sendo que alguns taquizoítos podem escapar e se desenvolver em bradizoítos, que irão se transformar em cistos em uma variedade de tecidos incluindo músculos esqueléticos e cérebro caracterizando assim a fase crônica da infecção podendo novamente se diferenciar em taquizoítos em indivíduos imunocomprometidos como, por exemplo, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (WOHLFERT; BLADER; WILSON, 2017).

A estrutura populacional de *T. gondii* é tanto geneticamente quanto clonalmente diversificada, podendo ser subdividida em três linhagens encontradas na América do Norte e Europa denominadas de cepas tipo I, II e III: as cepas do tipo II são encontradas predominantemente em pacientes com AIDS e causando toxoplasmose em humanos, já as cepas I e III são encontradas em doenças congênitas. As cepas do tipo I são geralmente

letais para camundongos, porém as cepas dos tipos II e III são menos virulentas (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). A transcrição de genes das células infectadas é drasticamente afetada incluindo aqueles genes envolvidos no metabolismo energético, resposta imune e sinalização (BLADER; MANGER; BOOTHROYD, 2001; STUTZ *et al.*, 2012).

A resposta à infecção por *T. gondii* tem sido extensivamente estudada e pode ser sumariamente dito que fagócitos e células *Natural Killer* (NK) são os principais efetores da resposta imune durante a fase inata (ORTIZ-ALEGRÍA *et al.*, 2010). Inicialmente, os receptores de reconhecimento padrão (*Toll Like Receptors*) são capazes de se ligar a moléculas dos parasitos. Em camundongos, TLR11 e TLR 12 se ligam à TgPRF iniciando uma forte resposta através da produção de IL-12 que mais efetivamente leva à resposta de genes induzidos por interferon (IRGs) (GAZZINELLI, RICARDO T. *et al.*, 2014). Em humanos os receptores responsáveis pela indução de IL-12 são TLR4, -8, -9 (MORGER *et al.*, 2014). As células inflamatórias que migram para o sitio primário de infecção são alvos dos parasitos que infectam, escapam dos mecanismos de eliminação de patógenos intracelulares e se camuflam dentro destas células afim de usá-las como “Cavalo-de Tróia” e circulam em tecidos mais distantes e imuno privilegiados como sistema nervoso central e olhos (DA GAMA *et al.*, 2004).

2.1 Ciclo de vida – *T. gondii*

A exposição humana à *T. gondii* ocorre de três formas principais a saber: ingestão de carne crua ou mal cozida contaminada com cistos, ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos liberados das fezes de felinos infectados pelo parasito, que são os hospedeiros definitivos, infecção por via placentária de gestantes primo-infectadas

durante a gravidez (MONTOYA; REMINGTON, 2008) sendo rara a transmissão do parasito quando a mãe foi infectada antes da gestação (SILVEIRA *et al.*, 2003).

Como hospedeiros definitivos para *T. gondii*, os felídeos são os únicos animais que liberam oocistos em suas fezes. A maioria das infecções nos felídeos ocorre após o nascimento através do consumo de carne infetada com cistos ou raramente, infecção por oocistos, embora infecções congênitas possam ocorrer (DUBEY; JONES, 2008). Gatos liberam oocistos após ingestão de qualquer dos três estágios infectantes de *T. gondii* e o período pré-patente vai depender da forma infectante ingerida por esses animais, variando de 3-10 dias com a ingestão de cistos, de 18 dias ou mais após a ingestão de oocistos e com o período de liberação muito variado após ingestão de taquizoítos (DUBEY, 2005). Após a ingestão de cistos pelos felinos, a parede é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado e se inicia o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii*. Cinco tipos morfologicamente distintos (estágios A-E) se desenvolvem nas células epiteliais intestinais antes da gametogonia se iniciar. Em seguida à fase assexuada, o ciclo sexual se inicia após a ingestão dos cistos ingeridos pelo animal com o desenvolvimento dos gametas masculinos e femininos que se fecundam e começa a formação da parede do oocisto que será liberado aos milhares nas fezes dos felinos em torno de 21 dias após sua infecção (DUBEY, 2009).

Os humanos podem adquirir *T. gondii* através da ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos, cisto tecidual encontrados em carne contaminada crua ou mal cozida, por transplantes de órgãos de doadores infectados, transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais ou congenitamente (DUBEY; JONES, 2008).

2.2 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita é identificada uma vez que o feto é infectado com bradizoítos. Devido a transmissão da doença ocorrer durante a primeira gestação, é raro a chance de uma segunda criança diagnosticada com a toxoplasmose congênita (HAMPTON, 2015). Mães que são previamente infectadas antes da gestação tem reduzidas chances de transmitir a doença ao feto, entretanto é recomendado que a gestação ocorra pelo menos 6 meses após a infecção inicial (MONTOYA; REMINGTON, 2008). Raramente casos de segunda infecção congênita de irmãos tem sido relatados em mães que estão em estados de imunossupressão, como é o caso da AIDS ou que tem longos tratamentos com corticosteróides (HAMPTON, 2015; LYNCH *et al.*, 2000). Mais de 90% das mulheres que adquirem infecção primária são assintomáticas, assim como 85% dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita. A transmissão é rara no início da gestação e aumenta com o decorrer da mesma, sendo frequentemente de 15% no primeiro trimestre, 30% no segundo e de 60% no terceiro trimestre de gestação (MONTOYA; REMINGTON, 2008). A exposição à infecção no primeiro trimestre causa toxoplasmose congênita mais grave, com o feto exposto no terceiro trimestre muito provavelmente deverá ser assintomática. Entretanto, embora recém-nascidos sejam assintomáticos ao nascimento, estudos tem mostrado que cerca de 90% deles exibem sintomas posteriormente, incluindo perda visual e auditiva e atraso no desenvolvimento (WILSON *et al.*, 1980).

A infecção por *T. gondii* durante a gestação exibe variados efeitos no crescimento do feto. Várias manifestações clínicas envolvem desde a prematuridade até a morte perinatal. A apresentação da infecção congênita pode resultar em graves impedimentos particularmente no desenvolvimento do feto como no cérebro e olhos. A tríade

característica da toxoplasmose congênita (corioretinite, hidrocefalia e calcificações cerebrais) normalmente identifica a presença da doença congênita ativa (HAMPTON, 2015).

3. Justificativa

Estudos estimam anualmente 190.000 novos casos de toxoplasmose congênita em todo o mundo (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013) e entender como o perfil imune durante a gestação responde à infecção por esse parasito que altera o tipo de resposta para um perfil inflamatório é de grande importância. Estudo anterior de nosso grupo demonstrou que animais C57BL/6 apresentaram um pior resultado da gestação em comparação à fêmeas BALB/c após a infecção oral por *T. gondii* devido a um maior nível de TNF sistêmico (COUTINHO *et al.*, 2012). Por isso tentar identificar o papel de mastócitos e células de glicogênio durante a gestação com relação à resposta imune em modelo de infecção congênita de fêmeas BALB/c e C57BL/6 as quais são, respectivamente, resistentes e susceptíveis à infecção por esse parasito, é importante para entender como essas células participam da resposta imune durante a gestação.

4. Objetivo Geral

Avaliar o papel de mastócitos e células de glicogênio em modelo de infecção congênita por *Toxoplasma gondii* em linhagem de camundongos C57BL/6 e BALB/c.

4.1 Objetivos Específicos

- Quantificar o parasitismo tecidual no útero/placenta, de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no primeiro dia ou 14º dia de gestação e eutanasiadas aos 8 ou 19 dias de infecção, respectivamente;
- Quantificar e caracterizar o perfil sistêmico e *in situ* de citocinas, através da análise de amostras de soro e homogenato de útero/placenta de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia ou 14º dia de gestação e eutanasiadas aos 8 ou 19 dias de infecção, respectivamente;
- Analisar o processo inflamatório através de cortes histológicos do útero/placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia ou 14º dia de gestação e eutanasiadas aos 8 ou 19 dias de infecção, respectivamente;
- Analisar e quantificar células de glicogênio através de cortes histológicos de placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 coradas com o corante ácido periódico de Schiff (PAS), infectadas ou não com *T. gondii* no 14º dia de gestação e eutanasiadas aos 19 dias de infecção;
- Caracterizar o perfil *in situ* de citocinas, assim como a expressão de mRNA por qPCR para *mcpt5*, *mcpt4*, *eNOS* e *igf2* no útero/placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no primeiro dia e eutanasiadas aos 8 dias de infecção;

- Verificar a presença de mastócitos totais no útero/placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia ou 14º dia de gestação e eutanasiadas aos 8 ou 19 dias de infecção, respectivamente;
- Avaliar os níveis de imunoglobulinas IgA específicas para *T. gondii* no soro/homogenato de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia ou 14º dia de gestação e eutanasiadas aos 8 ou 19 dias de infecção, respectivamente.

5. Materiais e Métodos

5.1 Animais de Experimentação

No presente estudo foram utilizados camundongos de 8 - 12 semanas de idade das linhagens camundongos BALB/c e C57BL/6, que foram fornecidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada.

5.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

5.3 Organismos Infecciosos

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss, os quais foram inoculados por via intraperitoneal com 5 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro foi removido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, estéril, pH 7.2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. Os cistos cerebrais foram contados sob microscopia de luz utilizando uma objetiva de 10x de aumento e utilizados para a infecção dos animais.

5.4 Acasalamento e Detecção de gestação

Fêmeas virgens foram acasaladas com machos das suas respectivas linhagens na proporção de duas fêmeas para cada macho até completarmos um mínimo de cinco animais para cada grupo experimental. Todos os dias, pela manhã, as fêmeas foram observadas para verificar a presença da rolha vaginal (mistura de sêmen com secreção vaginal). O dia da detecção desse sinal foi considerado como o primeiro dia de gestação. As fêmeas com presença da rolha vaginal foram separadas e infectadas por via oral no 1º ou 14º dia de gestação com *T. gondii* distinguindo dois grupos experimentais, um grupo que foi eutanasiados aos oito dias de gestação e infecção (8dg/8di) e o outro aos dezenove dias de gestação e 5 infecção (19dg/5di).

Grupos controles também foram avaliados sendo estes compostos por fêmeas não gestantes e não infectadas (ng/ni), bem não infectadas com oito de gestação (8dg/ni) e não infectadas aos dezenove dias de gestação (19dg/ni), assim como fêmeas não gestantes e infectadas analisadas aos oito (ng/8di).

5.5 Infecção Experimental, Coleta e Processamento do Material

Após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, considerado como primeiro dia de gestação, as fêmeas gestantes foram oralmente inoculadas com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* diluídos em 100 µl de PBS. No dia da eutanásia das fêmeas, de acordo com cada grupo experimental, foram anestesiadas com Cetamine (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazine (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009) e o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital. Após a retração do coágulo, o soro foi separado por centrifugação do sangue durante 5 minutos a 500 x g e

mantido a 80°C negativos até o momento do uso. As fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical e o útero, placenta e demais órgãos, tais como pulmão e cérebro, foram coletados e acondicionados de acordo com a finalidade experimental. Após o útero das fêmeas gestantes ser removido, os mesmos foram documentados quanto aos sítios de implantação/reabsorção. Para microscopia de luz, pulmão, cérebro, útero e placenta foram coletados e fixados em formol tamponado 10% e posteriormente incluídos em parafina.

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

5.6. Análises Histológicas

Para análises das alterações histológicas, útero e placenta foram fixados em formol tamponado 10%, processados para inclusão em parafina e os cortes histológicos foram confeccionados. Foi avaliada a infiltração de leucócitos no útero e placenta e no útero foi observada a infiltração de células inflamatórias e presença de necrose nos sítios de implantação. Os cortes teciduais de 4 μ m de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e capturados usando o escâner AT Turbo (Leica Biosystems Imaging) que permite a observação de todo o tecido para calcular a área e analisar as imagens teciduais com programa Aperio ImageScope.

5.7 Detecção de Mastócitos uterinos por Azul de Toluidina

Além disso, cortes histológicos de útero e placenta aos 8dg infectados ou não, após serem fixados, foram corados com Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos uterinos (uMC) por microscopia de luz, que foram expressos como o número de uMC/mm² levando em conta somente a área correspondente ao útero limitado os sítios de implantação (MEYER; WOIDACKI; MAURER; *et al.*, 2017).

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

5.8 Quantificação de células de glicogênio

Cortes da placenta de fêmeas aos 19dg infectadas ou não, foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de células de glicogênio. Essas células foram quantificadas usando o programa Aperio ImageScope versão v12.2.2.5015, aplicando um algoritmo para contagem de *pixels* positivos que separa e armazena esses pixels em três intensidades, considerando que a área ocupada pelas células de glicogênio corresponde à área da placenta com grande intensidade de coloração PAS positiva, esses dados foram expressos com área PAS positivas em relação à área total da placenta.

5.9 Análise do peso dos fetos

Os fetos das fêmeas gestantes aos 19 dias de ambas as linhagens, infectadas ou não, foram coletados após a eutanásia e imediatamente antes da coleta dos outros órgãos. Assim que foram retirados do útero e separados da placenta, foram colocados por poucos instantes em papel absorvente para retirar o excesso de líquido e então, pesados. Após esse procedimento, foram colocados em PBS com anestésico para que fossem eutanasiados caso não tivessem ocorrido durante a anestesia das fêmeas.

5.10 Imunohistoquímica para Detecção de Parasitos

O parasitismo tecidual foi avaliado no útero e placenta por imunohistoquímica como previamente descrito (BENEVIDES *et al.*, 2008). Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antígenico foi feito em tampão citrato, pH 6.0, em forno microondas e os sítios não específicos foram bloqueados por incubação dos cortes com leite desnatado 0,3% (Molico - Nestlé). Feito isso, os cortes foram incubados durante toda a noite, com um *pool* soro de camundongos Swiss previamente infectados com *T. gondii* diluído em saponina 0,01% (1:100) e, posteriormente, com anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo biotinilado (Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.), 1:500. A reação foi amplificada usando o sistema ABC (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) 1:100 e desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de estruturas como cistos

presentes nos campos microscópicos no útero/placenta. As análises foram feitas utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em 2 secções teciduais por camundongo e no mínimo 5 fêmeas por grupo experimental.

5.11 Ensaio de detecção de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA)

Os níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A presentes no soro e homogenato de útero e placenta dos grupos experimentais foram quantificados usando o *cytometric bead array assay* (CBA) (BD, San Jose, CA, USA) segundo recomendações do fabricante. Brevemente, as amostras de útero e placenta após a coleta foram colocadas em microtubos de fundo arredondado, pesadas e armazenadas em gelo. Foram adicionadas ao tubo das mesmas a solução de inibidores de protease, 1ml tampão PBS-EDTA 5 mM /200mg de tecido, Aprotinina A - 10 μ l (1mg/ml), Benzamidina - 10 μ l (100 μ m), Leupeptina - 20 μ l (5mg/ml) e PMSF - 10 μ l (160 μ m). Após a adição, as amostras foram homogeneizadas com homogeneizador ultra Turrax T 10 (IKA Works GmbH & Co. KG - Staufen – Alemanha) e centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. o sobrenadante foi coletado e armazenado em ultra freezer a - 80°C para posterior dosagem de citocinas. Os resultados das análises do homogenato e soro foram obtidos usando o citômetro FACSCanto II Flow Cytometer (BD, Biosciences, México) e analisados com o programa FACSDiva (BD Biosciences – San Jose, CA – USA).

5.12 Extração de RNA mensageiro e obtenção do DNA complementar

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Gibco BRL, USA). Para lizar as células, foi utilizado 1,0 ml de Trizol por $1,0 \times 10^6$ células, seguido de agitação vigorosa com a pipeta por 30 segundos, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1,0 ml de Trizol usado foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas em “vortex” e centrifugadas a $1.2000 \times g$ por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada em um tubo novo e foi adicionado o mesmo volume de isopropanol 100% gelado, agitado em “vortex” e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4C. Feito isso, foi acrescentado 1,0 ml de etanol 70% por 1,0 ml de Trizol, sendo a amostra homogeneizada em “vortex”, seguido de nova centrifugação a $7.500 \times g$ por 5 minutos a 4C. As amostras de RNA foram suspensas em 20 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo, então, as amostras armazenadas a -80° C. Para a obtenção da concentração de RNA/ul foi feita uma diluição de 1:50 nas amostras e determinadas usando o aparelho GeneQuant (GE, USA).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de reação de transcrição reversa, com a utilização de transcriptase reversa (Superscript II) e 5µg de RNA. As reações foram realizadas utilizando a enzima Taq polimerase no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para GAPDH, utilizados como controles positivos da reação de amplificação. A amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* utilizados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1.

Nome do gene	Sequência de <i>Primers</i>	
	Foward	Reverse
<i>Mcpt4</i>	5'-GAAGTGAAAAGCCTGACCTGC-3'	5'-CATGCTTGTGAACCCAAGG-3'
<i>Mcpt5</i>	5'-TACAGACAGGCCAGATCCCAT-3'	5'-TTGCCAGCCTGTGAGGAAA-3'
<i>eNOS</i>	5'TTCCCTGTCCCCTGCCTT-3'	5'-TTCTCCTGGTGATGCCTGC-3'
<i>Igf2</i>	5'-GAGGAAGCTCTGCTGTTGG-3'	5'-CAAAGAGATGAGAAGCACCAAC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GGAGAACCTGCCAAGTA TGATG-3'	5'-CAGTGTAGCCCCAAGATGCC-3'

5.12.1 Quantificação das mensagens de *eNOS*, *mcpt4*, *mcpt5* e *igf2* por reação de PCR quantitativa (qPCR)

A expressão quantitativa dos genes foi analisada através de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema SYBR Green (Invitrogen - USA) no aparelho ABI PRISM – 7500 sequence detection system (Applied Biosystems – USA). O cDNA foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green, determinado pelo fabricante. Os parâmetros da reação foram àqueles determinados pelo aparelho, utilizando-se a temperatura de 60°C para anelamento. Nas reações com o SYBR Green, um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (threshold cicle) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

5.13 Preparo do antígeno solúvel de taquizoítas (STAg)

O antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) foi preparado como descrito anteriormente (GAZZINELLI, R T *et al.*, 1991). Taquizoítas da cepa RH foram obtidos do peritônio de camundongos BALB/c infectados e depois centrifugados ($70 \times g/1$ min). O sobrenadante livre de células do camundongo foi centrifugado ($800 \times g/10$ min) para obtenção dos parasitas. Inibidores de protease foram adicionados e submetidos a 3 ciclos de criólise seguido de sonicação (8 ciclos de 30 segundos). Em seguida, o homogenato foi centrifugado ($10.000 \times g/10$ min, 4°C) e o sobrenadante foi coletado para quantificação proteica pelo método de Bradford. Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até momento do uso.

5.14 Detecção de anticorpos IgA específicos anti-*T. gondii*

Para a detecção de IgA específica anti-*T. gondii* microplacas de poliestireno de baixa afinidade (Kartell SPA, Novigilio, Milan, Italy) foram sensibilizadas durante a noite a 4°C com $10 \mu\text{g/ml}$ de Antígeno Solúvel de Taquizoítas (STAg). Após etapa de lavagens, as placas foram incubadas com amostras de soro e homogenato de útero/placenta diluídas 1:64. IgA específica foi detectada com anticorpo anti-IgA murino conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluído 1:2000 e incubado a 37°C . Após serem lavadas, a reação foi desenvolvida com cromógeno, 1,2-phenylendiamin OPD (Merck-Schuchardt, Germany), acrescido do substrato enzimático H_2O_2 a 0.03% e a densidade óptica (DO) foi lida a 492 nm. Os níveis de anticorpos foram

expressos como índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula: IE = média da densidade óptica da amostra/*cut off*, sendo o *cut off* calculado como a média da densidade óptica dos soros controles negativos mais 5 desvios padrão. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

5.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) dos grupos experimentais. A comparação de dados entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 foi analisada pelo teste *t* de *Student*, enquanto que a comparação entre as diferentes condições experimentais foi analisada pelo teste ANOVA (*Two-Way*) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 A infecção por *T. gondii* no início da gestação afeta o desenvolvimento embrionário de camundongos BALB/c e C57BL/6

Como o intuito de analisar os efeitos da infecção oral por *T. gondii* durante a gestação de camundongos fêmeas de C57BL/6 e BALB/c, nós infectamos as fêmeas no dia da detecção da rolha vaginal, que correspondia ao primeiro dia da gestação, e também no décimo terceiro dia de gestação. Fêmeas gestantes não infectadas de ambas as linhagens demonstraram sítios de implantação saudáveis com desenvolvimento normal no dia oitavo dia de gestação (8dg), exibindo embrião e placenta normais nos camundongos BALB/c (Figura 1A, E, I) e C57BL/6 (Figura 1B, G, K). Foi verificado que os sítios de implantação de fêmeas C57BL/6 infectadas exibiu extensas áreas de necrose na decídua mesometrial, edema e hemorragia entre os sítios de implantação bem como necrose do embrião (Figura 1D, H, L). Os sítios de implantação de camundongos fêmeas BALB/c infectadas exibiram aspecto quase normal, entretanto a maioria dos animais apresentou atraso no desenvolvimento embrionário (Figura 1C, F, J). A placenta da maioria das fêmeas de camundongos C57BL/6 aos 19dg/5di exibiu maiores pontos hemorrágicos e espessura da zona juncional além de vasos dilatados na decídua adjacente (Figura 1P) em comparação tanto às fêmeas de camundongos BALB/c infectados nas mesmas condições experimentais (Figura 1N) quanto aos camundongos não infectados aos 19 dg/ni (Figura 1 M e O).

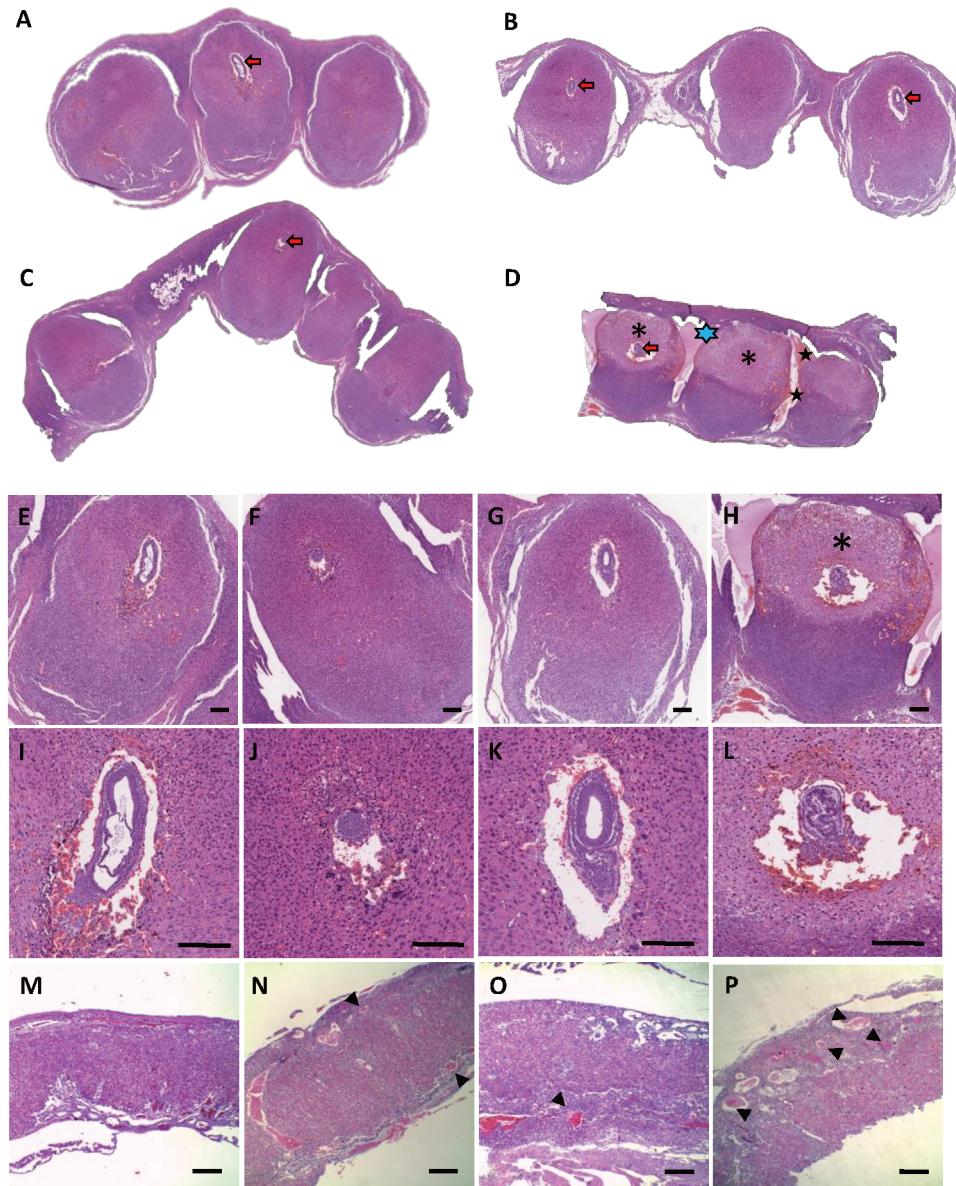


Figura 1. A infecção por *T. gondii* afeta o desenvolvimento embrionário de camundongos BALB/c e C57BL/6. Camundongos de ambas as linhagens foram eutanasiados aos 8dg/ni, 19dg/ni, 8dg/8di ou 19dg/5di. A-P: Cortes de útero/placenta foram corados com H&E. Fotomicrografia representativa de útero de BALB/c aos 8dg/ni (A,E,I); C57BL/6 aos 8dg/ni (B,G,K); BALB/c aos 8dg/8di (C,F,J); C57BL/6 aos 8dg/8di (D,H,L); BALB/c aos 19dg/ni (M) e aos 19dg/5di (N); C57BL/6 aos 19dg/ni(O) e aos 19dg/5di (P). Setas vermelhas indicam embrião; asterisco indica pontos de necrose no sítio de implantação; estrela azul indica edema em volta dosos sítios de implantação necróticos; estrela preta indica hemorragia intrauterina e cabeça de seta indica pontos hemorrágicos na decídua adjacente à placenta. Barra de escala = 200µm

6.2 Resultados negativos da gestação durante a infecção por *T. gondii* estão associados ao aumento de TNF e IL-6 sistêmicos e no local da interface materno fetal principalmente em camundongos C57BL/6

No sentido de verificar o perfil de citocinas sistêmica e localmente durante a toxoplasmose congênita, os níveis de TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram mensurados no soro e no homogenato de útero/placenta de camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 aos 8dg/8di e 18 dg/5di. Foi observado que ambas as linhagens apresentaram similares níveis elevados de IFN- γ nas amostras de soro aos 8di/ng e 8dg/8di comparados ao grupo ng/ni e 8dg/ni (Figura 2A). Entretanto, aos 19dg/5di, os níveis da citocina demonstraram-se significantemente diminuídas nos camundongos BALB/c e C57BL/6 ao compararmos aos grupos 8di/ng e 8dg/8di, e ainda, apesar de não estatisticamente significante, apresentaram maiores níveis desta citocina quando comparados ao grupo ng/ni. No homogenato de útero/placenta, os níveis de IFN- γ foram menores que os observados nas amostras de soro de ambas as linhagens. Os níveis da citocina foram maiores aos 8di/ng e 8dg/8di nos camundongos C57BL/6 quando comparados ao grupo ng/ni da mesma linhagem e, aos 8di/ng, os níveis de IFN- γ foram maiores que aos 8dg/ni (Figura3A). Com relação aos camundongos BALB/c os níveis de IFN- γ no homogenato foram maiores aos 8di/ng e 8dg/8di comparados àqueles observados aos 8dg/ni. Além disso, no terço final da gestação, os níveis desta citocina estavam aumentados no grupo dos animais que foram infectados (19dg/5di) quando comparamos ao grupo controle desta condição (19dg/ni) (Figura3A).

Quando analisamos o perfil da citocina TNF no soro, observamos que os níveis da citocina estavam aumentados nas amostras do grupo 8di/ng nos camundongos C57BL/6 comparados aos grupos ng/ni, 8dg/ni e 19dg/5di desta linhagem e além disso, os níveis

de TNF estavam aumentados também em relação ao grupo 8di/ng de BALB/c (Figura 2B). Observamos também que os níveis estavam aparentemente mais elevados nos grupos 8dg/8di em ambas a linhagens e aumentados nos camundongos da linhagem C57BL/6 em relação aos animais BALB/c apesar de não ser estatisticamente significante (Figura 2B). No homogenato os níveis de TNF foram maiores no grupo 8di/ng de camundongos C57BL/6 comparados ao grupo ng/ni e comparados também aos mesmos grupos dos camundongos BALB/c (Figura 3B). Nos grupos gestantes, os níveis de TNF estavam maiores no homogenato de camundongos C57BL/6 aos 8dg/8di aos observados nos grupos 8dg/ni e aos grupos 8dg/ni e 8dg/8di de camundongos BALB/c (Figura 3B). Além disso, aos 19dg/5di, os níveis de TNF estavam maiores nos camundongos C57BL/6 comparados aos BALB/c nesse mesmo período (Figura 3B) e camundongos BALB/c aos 19dg/ni apresentaram maiores níveis de TNF quando comparados aos grupos ng/ni e 8dg/ni (Figura 3B).

A citocina IL-6 foi detectada em maiores níveis nas amostras de soro de camundongos BALB/c no grupo ng/ni quando comparados ao mesmo grupo de camundongos C57BL/6 (Figura 2C). Entretanto, os níveis sistêmicos de IL-6 aos 8di/ng foram maiores em camundongos C56BL/6 comparados aos da linhagem BALB/c e os níveis da citocina aos 8di/ng foram maiores que aqueles detectados nos grupos 8dg/8di e 8dg/ni de camundongos C57BL/6 (Figura 2C). Além disso, os níveis de IL-6 estavam aumentados em camundongos C57BL/6 aos 8dg/8di quando comparado ao grupo ng/ni desta mesma linhagem (Figura 2C). Aos 19dg/ni os níveis de IL-6 foram maiores em camundongos C57/BL/6 quando comparado a essa mesma condição experimental de camundongos BALB/c e os níveis de IL-6 foram similares em ambas as linhagens aos 8dg/8di, além disso, os camundongos BALB/c apresentaram níveis elevados desta citocina quando comparados ao grupo 19dg/ni de sua linhagem (Figura 2C).

No homogenato durante o início da gestação (8dg/ni) os níveis de IL-6 encontraram-se aumentados em ambas a linhagens quando comparados aos grupos ng/ni e 8di/ng (Figura 3C). Entretanto, aos 8dg/8di os camundongos C57BL/6 apresentaram níveis elevados desta citocina no homogenato em comparação aos grupos ng/ni, 8dg/ni e 18de/5di de sua linhagem (Figura 3C) e quando comparados ao grupo 8dg/8di de camundongos BALB/c, também apresentaram maiores níveis de IL-6 no homogenato (Figura 3C).

Os níveis sorológicos de IL-2 foram maiores em BALB/c aos 8dg/8di comparados ao seu grupo 8dg/ni e os camundongos C57BL/6 apresentaram níveis maiores da citocina aos 8di/ng comparados àqueles mensurados no soro de BALB/c também aos 8di/ng (Figura 2D). De forma contrária, no homogenato os níveis de IL-2 foram significantemente maiores em BALB/c nos grupos ng/ni, 8di/ng e 8dg/8di quando comparados a esses mesmos grupos de camundongos C57BL/6 (Figura 3D), sendo que o maior nível desta citocina foi encontrado nos camundongos BALB/c aos 8dg/8di. Além disso, os níveis desta citocina em camundongos C57BL/6 foram menores no grupo 8di/ng quando comparado ao grupo 8dg/ni (Figura 3D).

Camundongos C57BL/6 apresentaram nas amostras de soro aos 19dg/ni os maiores de IL-17 e aos 8dg/8di, os menores níveis quando comparados a esses mesmos grupos de camundongos BALB/c. No homogenato os níveis de IL-17 foram maiores nos grupos ng/ni, 8di/ng ou 8dg/8di de camundongos BALB/c em comparação aos C57BL/6 nas mesmas condições (Figura 3E).

Quando analisamos IL-4, observamos que o grupo de camundongos BALB/c ng/ni apresentou maiores níveis da citocina nas amostras de soro quando comparados aos camundongos C57BL/6 nesta condição; e também aos 8dg/8di comparados à C57BL/6 na mesma condição experimental (Figura 2F). Camundongos C57BL/6 aos 19dg/5di

apresentaram maiores níveis de IL-4 comparados aos animais do grupo ng/ni de sua linhagem (Figura 2 F). A análise das amostras de homogenato de BALB/c apresentou maiores níveis de IL-4 em relação às amostras de C57BL/6 nos grupos ng/ni e 8di/ng (Figura 3F). Os níveis da citocina foram menores aos 8di/ng quando comparados aos grupos 8dg/ni e 19dg/5di de C57BL/6 (Figura 3F).

E por fim, IL-10 demonstrou níveis significantemente elevados no soro de camundongos C57BL/6 aos 8di/ng comparados ao grupo ng/ni ou 8dg/ni (Figura 2G). Os camundongos BALB/c apresentaram níveis significantemente elevados aos 8dg/8di quando comparados ao grupo 19dg/5di desta linhagem (Figura 2G). Nas amostras de homogenato não há alteração dos níveis da citocina tanto em relação aos grupos experimentais quanto à linhagem (Figura 3G).

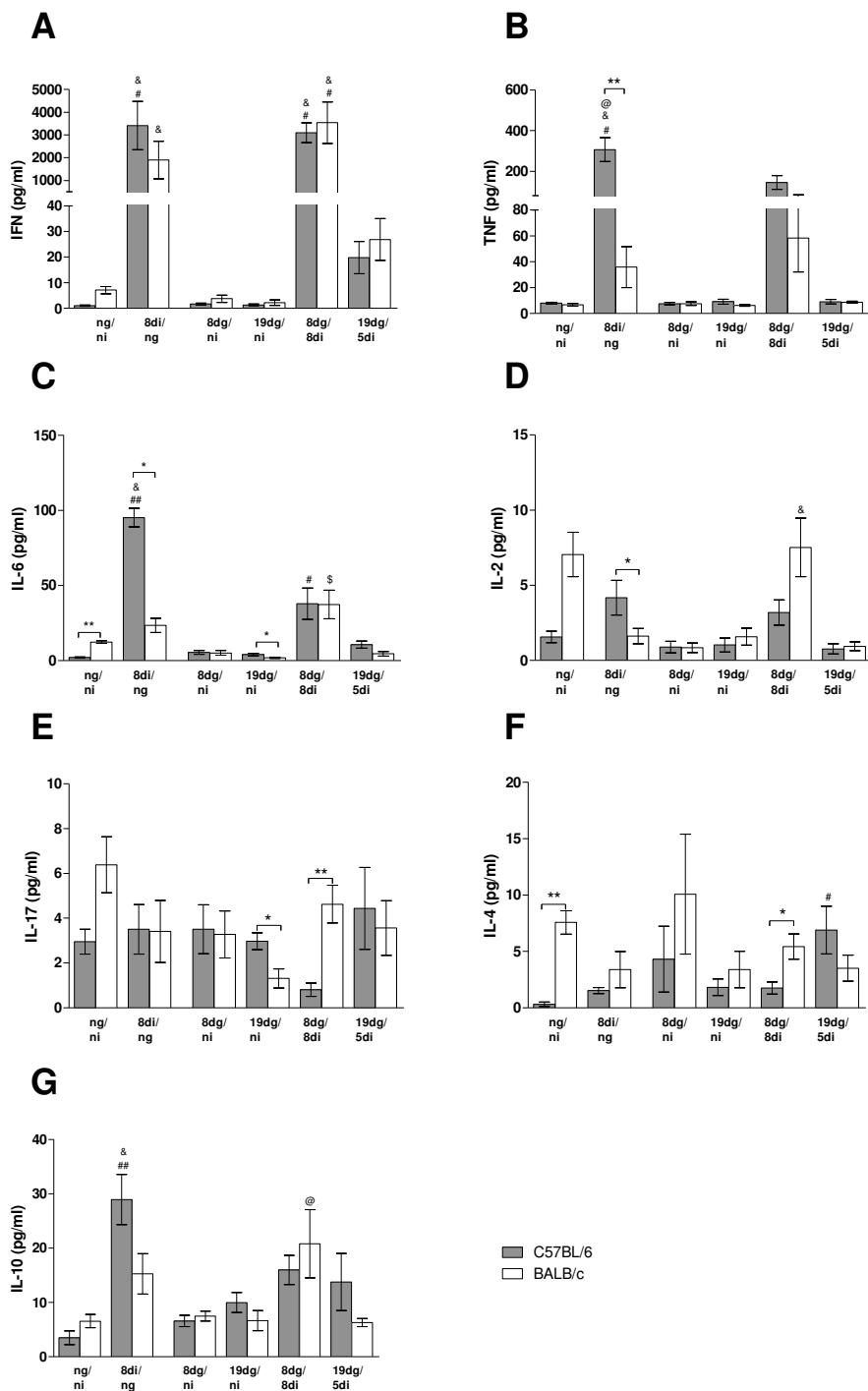


Figura 2. Mensuração de citocinas no soro. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram acasalados e a detecção da rolha vaginal foi considerado o dia 1 da gestação (dg); a infecção ocorreu via oral com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Foram analisadas fêmeas aos 8dg/ni e 19dg/ni ou aos 8dg/8di e 19dg/5di. Amostras de camundongos não gestantes e não infectados (ng/ni) foram usadas como controle. Detecção dos níveis de TNF (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-17 (D) IL-2 (E), IL-4(F), IL-10(G). *estatisticamente diferente em relação ao respectivo controle ni. (Two-way ANOVA, Bonferroni post-test, $p < 0.05$).

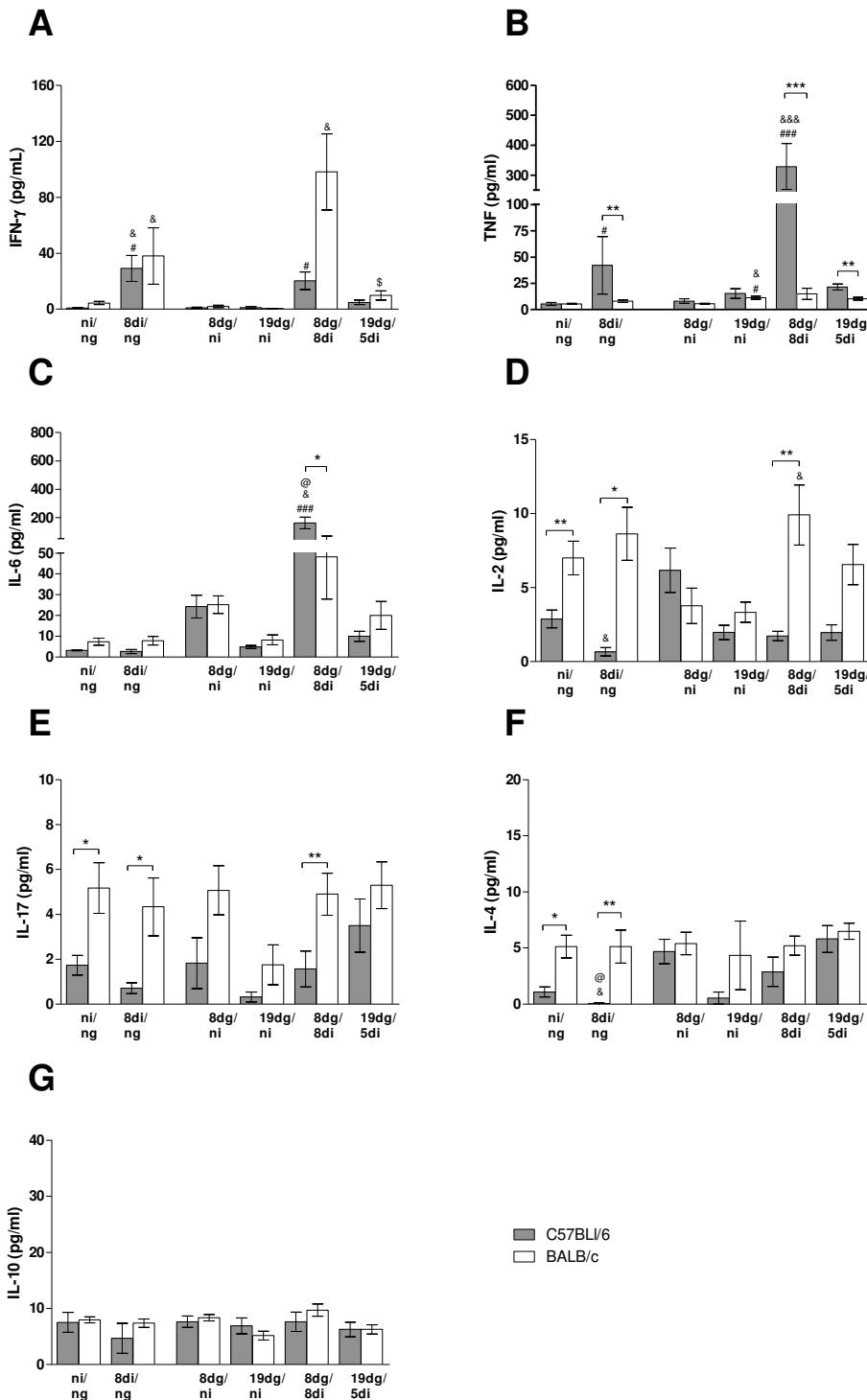


Figura 3. Mensuração de citocinas no homogenato de útero/placenta. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram acasalados e a detecção da rolha vaginal foi considerado o dia 1 da gestação (dg); a infecção ocorreu via oral com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Foram analisadas fêmeas aos 8dg/ni e 19dg/ni ou aos 8dg/8di e 19dg/5di. Amostras de camundongos não gestantes e não infectados (ng/ni) foram usadas como controle. Detecção dos níveis de TNF (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-17 (D) IL-2 (E), IL-4(F), IL-10(G). *estatisticamente diferente em relação ao respectivo controle ni. (Two-way ANOVA, Bonferroni post-test, $p < 0,05$).

6.3 Mastócitos uterinos aumentam em número em camundongos C57BL/6 quando infectadas por *T. gondii*

A análise da detecção de mastócitos uterinos (uMCs) usando a coloração por Azul de Toluidina revelou que essas células estavam localizadas principalmente em volta do sítio de implantação no endométrio (Figura 4B). Quando comparamos os grupos controle (ng/ni) de ambas as linhagens, observamos que os camundongos de C57BL/6 apresentaram quantidade maior ($p = 0,0078$), além disso os camundongos C57BL/6 aos 8dg/8di também apresentaram um maior recrutamento de mastócitos ao útero quando comparado ao mesmo grupo da linhagem de BALB/c ($p = 0,0079$) (Figura 4A). A quantidade de uMCs encontrada no útero de camundongos C57BL/6 aos 8di/ng foi significativamente maior ($p<0,05$) quando comparado ao grupo ng/ni da mesma linhagem. E quando o grupo 8di/ng de camundongos C57BL/6 foi comparado aos outros grupos, encontramos que houve diferença significante em relação ao 8dg/ni e 8dg/8di de C57BL/6 ($p<0,05$) e houve também diferença na quantidade de uMCs entre o grupo 8di/ng de camundongos BALB/c ($p<0,05$) - Figura 4A. Com relação aos camundongos da linhagem BALB/c não foi observada diferenças na quantidade de uMC entre os grupos analisados dessa linhagem, independentemente de estarem infectados ou não.

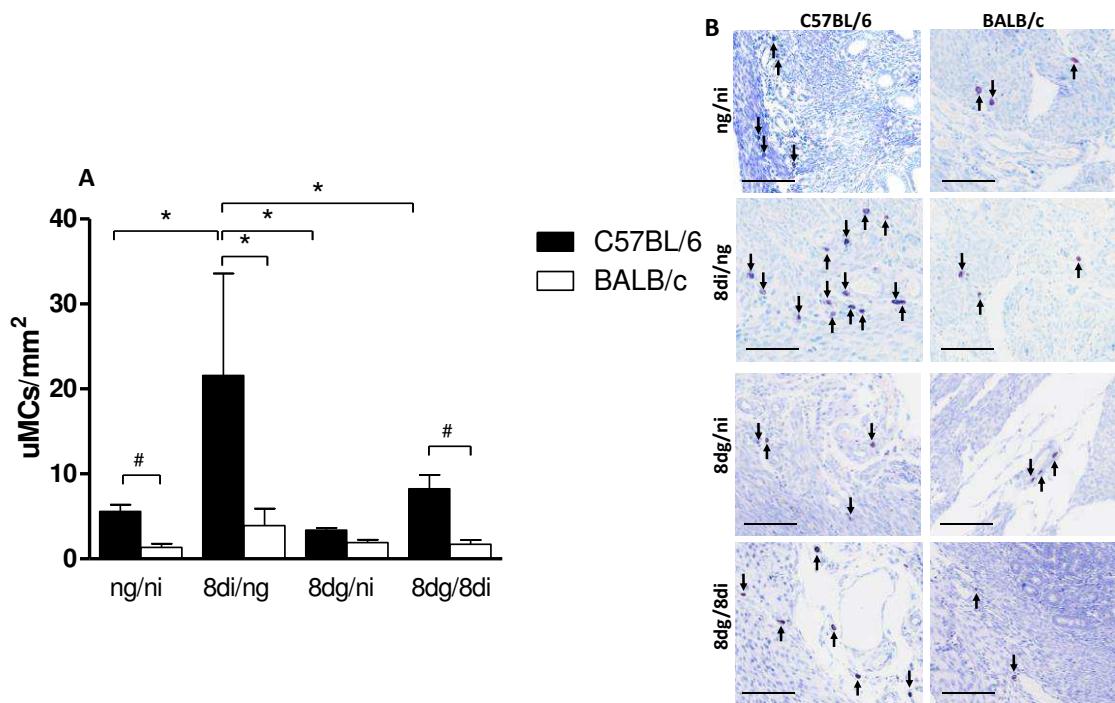


Figura 4. Mastócitos uterinos (uMC) estão aumentados em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii*. camundongos C57BL/6 e BALB/c foram oralmente infectados com 5 cistos de ME-49 de *T. gondii* no dia da detecção da rolha vaginal e eutanasiados 8 dias depois (8dg/8di) e os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina para identificação e quantificação de mastócitos uterinos (uMCs). A: número de uMCs por área tecidual. B: Fotomicrografias representativas de lâminas de útero/placenta dos grupos analisados, setas indicam uMCs. Barra de escala = 100mm. O teste *t* de Student foi aplicado para determinar a diferença estatística entre as linhagens nas mesmas condições (#), enquanto que as comparações entre as diferentes condições entre as linhagens foram analisadas pelo teste ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (*). Dias de gestação (dg); dias de infecção (di).

6.4 Células de glicogênio estão aumentadas na placenta de camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii*

Uma vez que grandes mudanças metabólicas são produzidas para uma eficiente nutrição do embrião/feto (LAIN; CATALANO, 2007), nós analisamos a glicemia dos grupos experimentais e quantificamos a presença de células de glicogênio na placenta a termo. Não foi observado mudanças substanciais nos níveis de glicemia entre os grupos analisados (Figura 5A e B). Quando analisamos a presença de células de glicogênio na placenta através da coloração de lâminas por PAS, foi observado que camundongos C57BL/6 do grupo 19dg/5di apresentaram maiores quantidades ($p = 0,0294$) destas células quando comparados ao grupo 19dg/5di de camundongos BALB/c e 19dg/ni de C57BL/6 ($p = 0,0031$) - Figura 5C. Nota-se uma intensa coloração (Figura 5G) quando observada as fotomicrografias das lâminas dos outros grupos (Figuras F, H e I) e observamos ainda, um pequeno aumento na espessura da zona juncional (Figura 5D) e uma redução da camada labirinto (Figura 5E). Camundongos BALB/c aos 19dg/ni apresentaram quantidades similares de células de glicogênio ao grupo 19dg/5di (Figura 5D, F e H), demonstrando um padrão das células de glicogênio. Não foi observado mudanças na espessura na zona juncional ou camada de células do labirinto nos grupos de animais de camundongos BALB/c (Figura 5D e E). A placenta da maioria das lâminas analisadas dos camundongos C57BL/6 aos 19dg/5di demonstrou uma espessura maior da zona juncional e vasos dilatados na decídua adjacente (Figura 1P) em comparação aos grupos 19dg/ni de ambas a linhagens e 19dg/5di de BALB/c (Figura 1M, N, O).

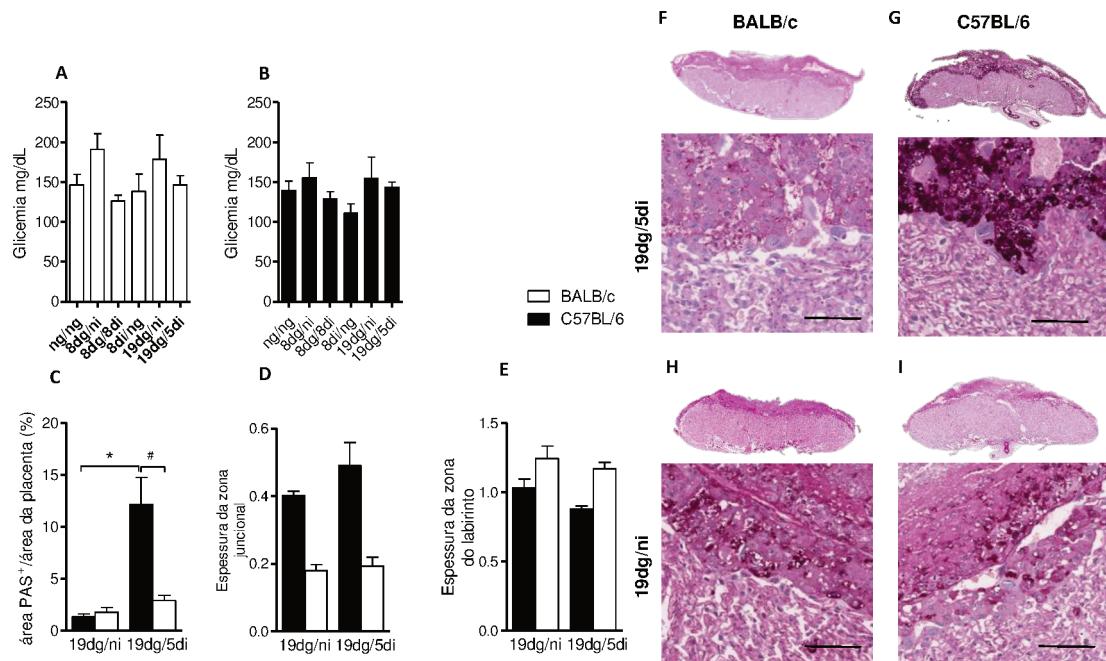


Figura 5. quantidade de células de glicogênio estão aumentadas em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii*. camundongos C57BL/6 e BALB/c foram oralmente infectados com 5 cistos de ME-49 de *T. gondii*. Cortes da placenta de fêmeas BALB/c e C57BL/6 aos 19dg infectadas ou não e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de células de glicogênio; para quantificação de índices glicêmicos foi utilizado o kit da LabTest segundo recomendações do fabricante. Glicemia de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B). Área de células PAS+ (C), espessura da zona juncional (D) e espessura da zona do labirinto (E) de placenta de camundongos aos 19dg/ni ou 19dg/5di de ambas as linhagens. Fotomicrografias representativas de placenta de camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 19dg/ni ou 19dg/5di corados com PAS. Barra de escala = 100mm. O teste *t* de Student foi aplicado para determinar a diferença estatística entre as linhagens nas mesmas condições (#), enquanto que as comparações entre as diferentes condições entre as linhagens foram analisadas pelo teste ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (*). Dias de gestação (dg); dias de infecção (di).

6.5 Produção de IgA anti-*T. gondii* não aumenta em camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 infectadas pelo parasito

Ao analisarmos o perfil de produção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* nas amostras de soro de camundongos BALB/c, encontramos que a infecção pelo parasito não induziu a produção de IgA aos 8 (8dg/8di, 8di/ng) ou 5 (19g/5di) dias de infecção na maioria dos animais analisados. Apesar de observarmos índice ELISA acima do *cut off* (Figura 6A). Resultados similares foram observados quando foram analisadas amostras de homogenato (Figura 6B). Os camundongos C57BL/6 apresentaram perfil similar, não sendo observada a detecção de IgA específica nas amostras de soro ou homogenato dos animais infectados (Figura 6C e D). Esses resultados sugerem que IgA específica não parece participar da resposta imune contra o parasito em animais gestantes e não gestantes aos 8 ou 5 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*.

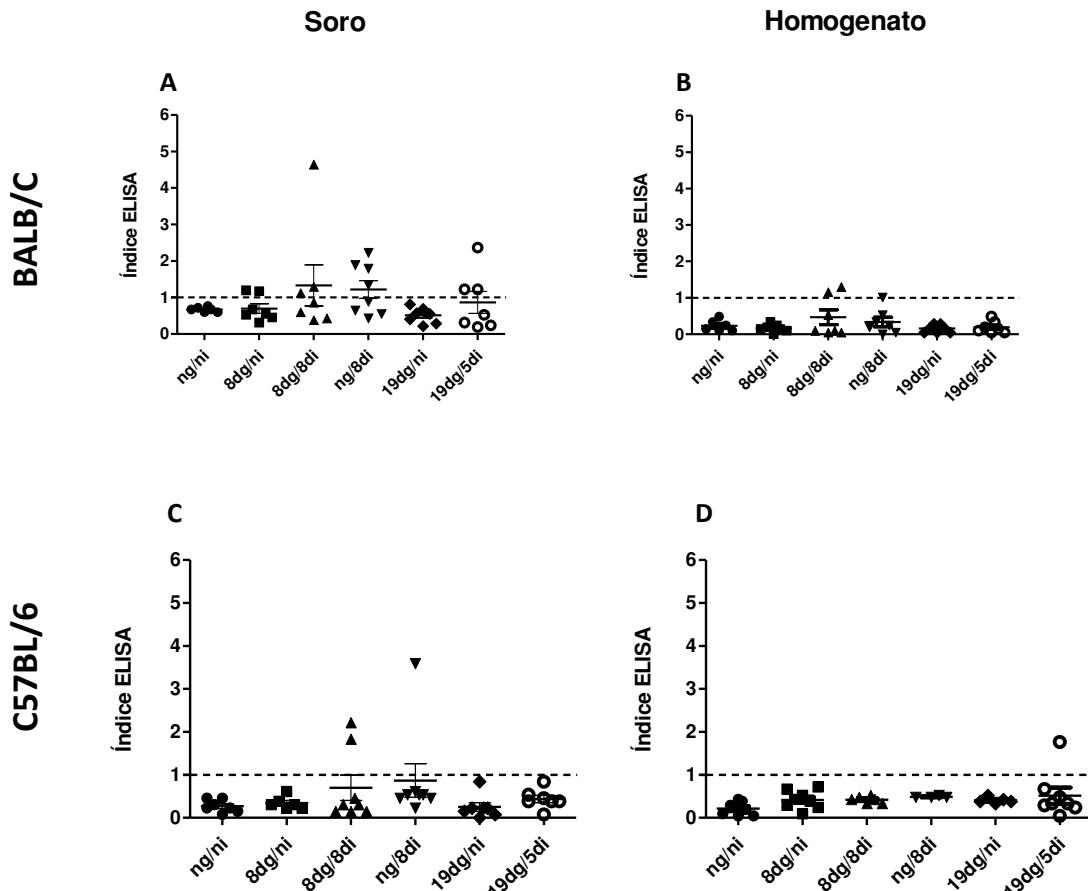


Figura 6: Níveis de IgA total anti-*T. gondii* em amostras soro e homogenato de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 ng/ni; 8di/ng; 8dg/8di; 8dg/ni; 19dg/ni e 19dg/5di. Infecção com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, por via oral. As fêmeas foram infectadas com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral, as amostras foram coletadas nos tempos indicados e os níveis de anticorpos foram mensurados pelo teste ELISA e representados pelo Índice ELISA (I.E.). Não gestantes (ng); Não infectadas (ni); Dias de gestação (dg); Dias de infecção (di).

6.6 A expressão de *igf-2* é aumentada em camundongos C57BL/6 após a infecção por *T. gondii* no final da gestação

Em relação à expressão de *eNOS* na placenta/útero por qPCR, observamos que camundongos BALB/c não apresentaram aumento da expressão da enzima no grupo 8dg/ni quando comparados aos animais do grupo ng/ni. De maneira interessante, a infecção diminuiu a expressão da enzima em relação aos animais aos 8dg/8di. Apesar de não ser observada diferença estatística, os camundongos C57BL/6 apresentaram um aumento da expressão da enzima aos 8dg/ni e a infecção foi capaz de diminuir a expressão (Figura 7A).

A expressão de proteases liberadas por mastócitos também foi avaliada na placenta/útero por qPCR em camundongos BALB/c e C57BL/6 no terço inicial da gestação. Em relação a *mcpt4* não observamos diferença estatística na expressão da protease em ambas as linhagens de camundongos quando os animais foram infectados com o parasito (Figura 7 B). Quando avaliamos a expressão de *mcpt5* observamos uma diminuição da expressão da enzima quando os animais de ambas as linhagens estavam gestantes (8dg/ni) e após serem infectados (8dg/8di), apesar de não ser estatisticamente significante (Figura 7 C).

Por fim avaliamos a expressão de *igf-2* na placenta no terço final da gestação e notamos que houve um aumento significante na expressão ($p < 0,05$) quando comparamos camundongos C57BL/6 aos 19dg/5di ao grupo 19dg/ni não sendo observado esse mesmo resultado em camundongos BALB/c (Figura 7D).

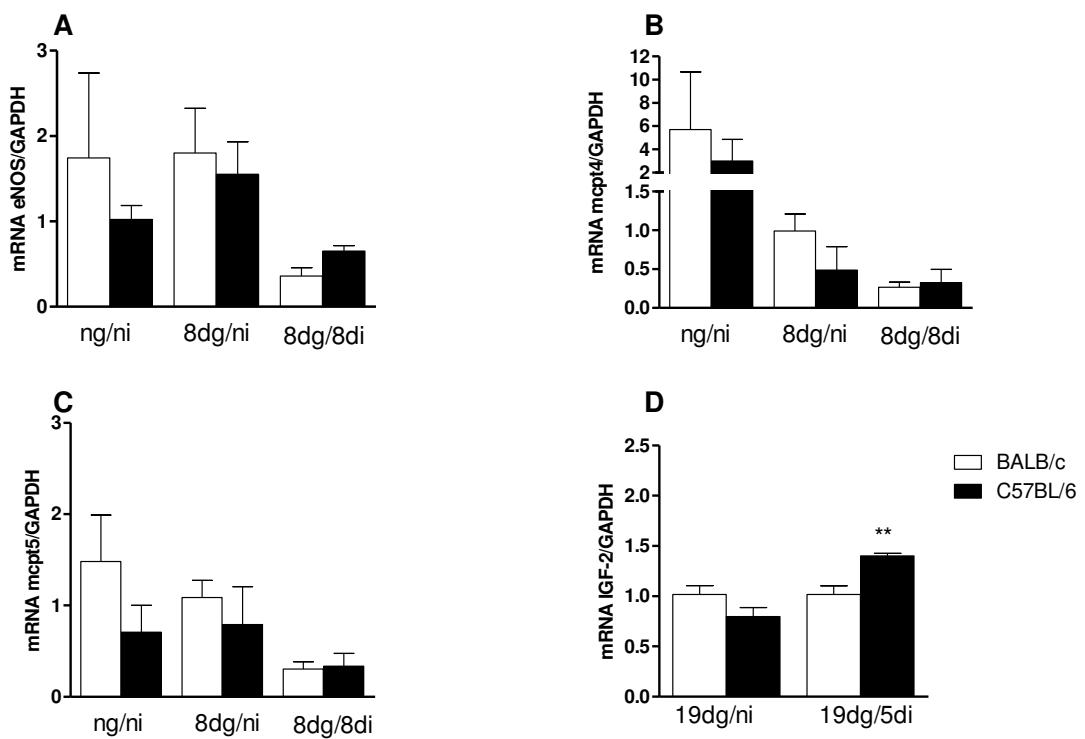


Figura 7: Quantificação das mensagens para eNOS (A), *mcpt4* (B), *cma1* (C) e *igf2* (D) em amostras de útero/placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 ng/ni; 8di/ng; 8dg/8di; 8dg/ni; 19dg/ni e 19dg/5di. Infecção com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, por via oral. Os níveis de mRNA foram mensurados por reação de PCR quantitativa (qPCR). *Diferença significativa entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Two-way ANOVA, pós-teste de Dunns, $p < 0,05$). Dias de infecção (di), Dias de gestação (dg); Não infectadas (ni); Não gestantes (ng).

6.7 A infecção por *T. gondii* diminui o peso dos fetos em camundongos BALB/c, mas não em camundongos C57BL/6

Quando as fêmeas de ambas as linhagens foram eutanasiadas aos 19 dias de gestação para a coleta de amostras, comparamos o peso dos fetos coletados de fêmeas BALB/c gestantes aos 19dg/ni com o peso dos fetos de gestantes aos 19dg/5di e observamos que a infecção por via oral com *T. gondii* fez com que houvesse uma redução significante ($p < 0,001$) no peso dos mesmos (Figura 8), contudo não observamos uma redução no peso dos fetos quando comparamos os grupos 19dg/ni e 19dg/5di das fêmeas C57BL/6 (Figura 8).

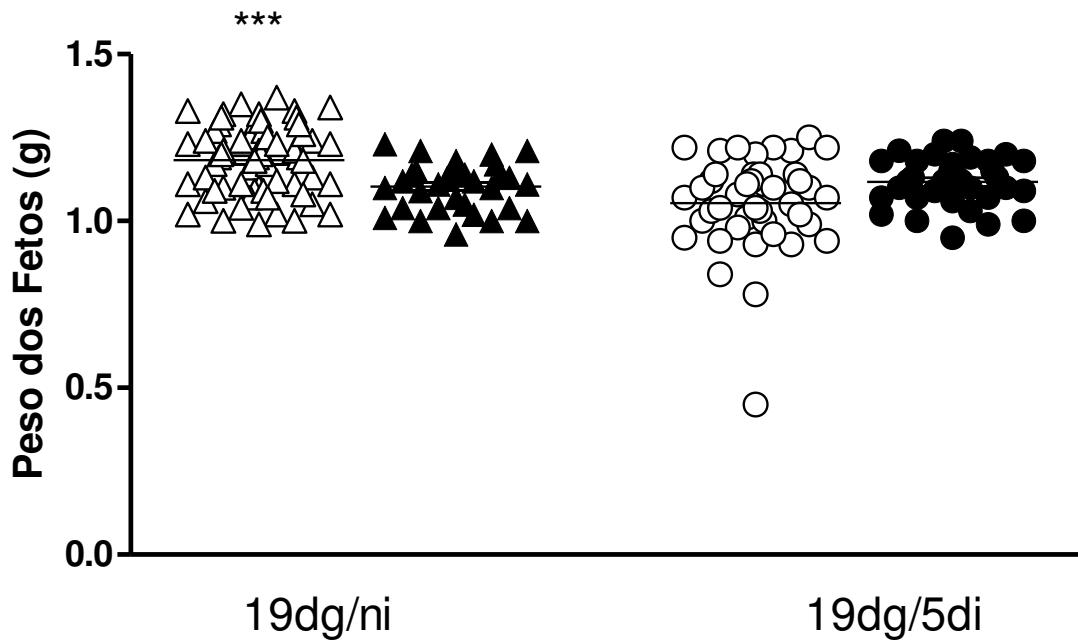


Figura 8: A infecção congênita por *T. gondii* diminui o peso dos fetos em camundongos BALB/c, mas não em C57BL/6. Os fetos foram retirados do útero, separados da placenta e pesados após a eutanásia das fêmeas aos 19 dias de gestação em condições de infecção ou não. Infecção com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral). ***Diferença significativa entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Two-way ANOVA, pós-teste de Dunns, $p<0,001$). Dias de infecção (di), Dias de gestação (dg); não infectadas (ni).

7. Discussão

Foi previamente demonstrado por nosso grupo que camundongos C57BL/6 infectados oralmente por *T. gondii* apresentam piores resultados na gestação com 90% de taxa de aborto quando comparados à camundongos BALB/c, que apresentaram 50% de taxa de aborto aos 19dg/18di e que estava associado a altos níveis de TNF nas amostras de soro (COUTINHO *et al.*, 2012). Portanto, para adicionalmente investigar os mecanismos envolvidos nas altas taxas de aborto observadas em ambas as linhagens de camundongo sob infecção congênita por *T. gondii*, que eram maiores ainda em camundongos C57BL/6, e também para analisar os efeitos da infecção no primeiro e terceiro terço da gestação, nós infectamos camundongos BALB/c e C57BL/6 no dia da detecção da rolha vaginal e no 14º dia da gestação. Como foi previamente demonstrado (COUTINHO *et al.*, 2012), a maioria dos camundongos C57BL/6 infectados no dia da detecção da rolha vaginal apresentaram elevadas quantidades de sítios de implantação necróticos no útero aos 8dg/8di enquanto que os camundongos BALB/c apresentaram grandes quantidades de sítios de implantação normais no mesmo período de gestação.

Além disso, a infecção também afetou a placenta de camundongos C57BL/6 em maiores níveis quando comparadas às de camundongos BALB/c. Durante a gestação, uma fina regulação no microambiente da interface materno-fetal é necessária para a tolerância do feto e para o sucesso da gestação, a qual células Treg medeiam esse processo (ZENCLUSSEN *et al.*, 2006). Portanto, o sistema imune realiza um papel central nesse balanço pela modulação de células e citocinas durante a implantação e por toda a gestação (DEKEL *et al.*, 2010; WARNING; MCCRACKEN; MORRIS, 2011). Várias populações de células reguladas endocrinamente a partir da imunidade inata e adaptativa contribuem para este balanço, secretando mediadores químicos que promovem importantes processos

como tolerância, crescimento, vascularização e proteção contra patógenos (SCHUMACHER; COSTA; ZENCLUSSEN, 2014).

Estudos anteriores demonstraram que uMCs são necessários para o remodelamento tecidual durante a implantação, placentação e crescimento fetal através da liberação do conteúdo de seus grânulos (WOIDACKI; JENSEN; ZENCLUSSEN, 2013). Mastócitos uterinos e células *Natural Killer* (uNK) tem efeitos similares no remodelamento das artérias espiraladas e placentação, efeitos os quais são contrabalanceados entre essas células (MEYER; WOIDACKI; MAURER; *et al.*, 2017). A secreção de quimases por uMCs são cruciais para o estabelecimento da gestação, uma vez que animais deficientes em *mcpt5*, uma importante quimase de ambos os tipos celulares, exibem um pobre remodelamento das artérias espiraladas e restrição do crescimento fetal (MEYER; WOIDACKI; KNÖFLER; *et al.*, 2017).

Já foi demonstrado que mastócitos podem causar danos aos taquizoítos de *T. gondii* *in vitro* através da degranulação e liberação de LTB4 (HENDERSON; CHI, 1998). *In vivo*, foi demonstrado que a infecção com a cepa RH de *T. gondii* via intraperitoneal induz a um aumento do número de mastócitos na conjuntiva e limbo do olho de *Calomys callosus* (GIL *et al.*, 2002). Camundongos *outbread* Kunning infectados com a cepa RH intraperitonealmente e tratados com o composto 48/80 (C48/80), que é conhecido pela indução de ativação e degranulação de mastócitos, aumenta a inflamação no fígado, baço, mesentério e aumenta também o parasitismo nesses órgãos e no fluido de lavado peritoneal (HUANG *et al.*, 2013). Quando oralmente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, camundongos congenitamente deficientes em mastócitos (W/W^v) foram mais suscetíveis a infecção e também apresentaram maior parasitismo intestinal, e ainda, apresentaram atraso na resposta de linfócitos Th1, uma vez que os níveis de IFN- γ e IL-12 atingiram o pico mais tarde numa fase posterior da infecção (CRUZ *et al.*,

2014). No presente estudo foi observado que a infecção por *T. gondii* durante a gestação induziu um significante recrutamento de mastócitos ao útero de camundongos C57BL/6, os quais foram maiores comparados aos camundongos BALB/c. A migração de mastócitos ao útero não mostrou-se estar envolvido no controle do parasitismo, e por outro lado, a presença da maior quantidade desse tipo celular poderia estar relacionada a grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF observado nos camundongos C57BL/6. De acordo foi previamente demonstrado que a ativação de mastócitos na infecção por *T. gondii* induz a expressão aumentada INF- γ , IL-12p40 e TNF no fígado, e INF- γ , IL-12p40 no baço (HUANG *et al.*, 2013). Portanto, apesar do papel crucial de uMCs para auxiliar a gestação, o número exacerbado dessas células aos 8dg/8di pode estar envolvido na maior resposta pró-inflamatória e pior resultado durante a toxoplasmose congênita em camundongos C57BL/6.

No presente estudo, camundongos C57BL/6 apresentaram altos níveis de TNF e IL-6 no soro e homogenato de útero/placenta aos 8dg/8di em comparação ao grupo controle 8dg/ni. Este resultado está de acordo com os resultados de El-Hashimi *et al* (EL-HASHIMI *et al.*, 2014), que reportaram que trofoblastos de placenta de mulheres soropositivas para *T. gondii* que abortaram, expressaram maiores níveis de TNF- α e IL-6 que mulheres que abortaram e eram soronegativas e também àquelas em que o aborto foi induzido. Além disso, resultados gestacionais adversos durante a infecção experimental congênita por *T. gondii* têm sido associados à altas concentrações de TNF- α (ZHAO *et al.*, 2017). Ambos, TNF e IL-6 são quimioatrativos para mastócitos, sendo responsáveis pelo acúmulo dessas células em sítios inflamatórios (MISIAK-TŁOCZEK; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, 2009). Altos níveis de IL-6 produzidos por macrófagos e mastócitos na interface materno-fetal, e por trofoblastos e células deciduais, estão diretamente envolvidos no aborto murino (ZENCLUSSEN *et al.*, 2003). Aqui foi

demonstrado que o útero de camundongos C57Bl/6 apresentaram maiores quantidades de mastócitos em paralelo com altos níveis de IL-6, sugerindo efeitos sinérgicos de TNF, IL-6 e grande quantidade de mastócitos no pior resultado da gestação desta linhagem de camundongo.

Outros fatores inerentes da infecção que podem ter cooperado para este fenômeno são os níveis hormonais. Foi previamente demonstrado que explantes de vilos placentários humanos infectados com a cepa 2F1 de *T. gondii* apresentaram altos níveis de estradiol, progesterona e hormônio beta-gonadotrofina humano (beta-HCG) quando comparados aos controles não infectados e a redução do níveis hormonais foram compatíveis com a menor carga parasitária nos explantes (CASTRO-FILICE *et al.*, 2014). Mulheres gestantes soropositivas para *T. gondii* nos primeiros 4 meses de gestação têm também exibido maiores níveis de estradiol do que mulheres gestantes não infectadas pelo parasito (AL-WARID; AL-QADHI, 2012). Estradiol e progesterona demonstraram induzir aumento da migração de mastócitos ao útero bem como sua maturação, aumentando a expressão de mRNA de *Mcpt-1*, *Mcpt-5* e *Mcpt-8* em útero de camundongos, e também a degranulação deste tipo celular (JENSEN *et al.*, 2010).

Era esperado que os níveis de IFN- γ *in situ* poderia estar envolvido nos resultados gestacionais negativos observados em camundongos C57BL/6 comparados ao BALB/c, uma vez que a expressão de mRNA desta citocina em placenta murinas infectadas com 30 cistos da cepa Fukaya foi maior aos 19dg/7di em camundongos C57BL/6, os quais apresentaram menores taxas de filhotes vivos comparados aos camundongos BALB/c nas mesmas condições (SHIONO *et al.*, 2007); e animais C57BL/6 e BALB/c IFN- γ /- apresentaram comparativamente 100% de taxa de nascimento sob infecção por *T. gondii* (SHIONO *et al.*, 2007). Além disso, camundongos 129 Sv IFN- γ R/- apresentaram menores níveis de reabsorção fetal que foi acompanhada pela não dilatação das artérias

espiraladas e apoptose celular placentária (SENEGAS *et al.*, 2009). Entretanto, este não foi o caso em nossos experimentos, como observamos que a infecção com a cepa ME-49 no dia da detecção da rolha vaginal induziu um maior e similar nível de IFN- γ no homogenato das duas linhagens de camundongo. Foi demonstrado por nosso grupo que os piores resultados da toxoplasmose gestacional em camundongos C57BL/6 comparados aos de animais BALB/c podem estar associados com a produção sistêmica de TNF que foi correlacionada com apoptose celular e necrose dos sítios de implantação (COUTINHO *et al.*, 2012). Portanto, em nosso estudo, os resultados desfavoráveis e impedimento do desenvolvimento do embrião em camundongos C57BL/6 foi mais correlacionado com os altos níveis de TNF e IL-6 do que com os níveis de INF- γ no homogenato de útero/placenta.

Relacionado à IL-17, camundongos C57BL/6 infectados intraperitonealmente com 200 taquizoítas da cepa RH aos 8 dias de gestação e analisados aos 6 dias de infecção apresentaram elevados números de células produtoras de IL-17 e reduzidos de células Tregs (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$) na placenta e baço e ainda, estavam associados à alta expressão de IL-17A, ROR γ t e IL-6, e reduzida expressão de Foxp3 e TGF- β na placenta comparados com animais não infectados (HUANG *et al.*, 2013). Em nosso modelo experimental, demonstramos que quando infectamos camundongos por via oral com a cepa ME-49 no início ou no dia 14 de gestação, camundongos C57BL/6 não apresentaram aumento nos níveis sorológicos de IL-17 nem no homogenato de placenta/útero, sugerindo que essa citocina não estava envolvida nos resultados negativos dessa linhagem de camundongo.

Foi demonstrado previamente que camundongos B6/129 IL-4 $^{+/+}$ e B6/129 IL-4 $^{-/-}$ infectados com 20 cistos da cepa Bervely por via oral no dia 12 de gestação exibiram 17% e 11% de morte fetal, respectivamente; e 50% dos fetos não estavam infectados,

mostrando que a transmissão congênita da doença não depende de IL-4 (ALEXANDER *et al.*, 1998). Além disso, camundongos C57BL/6 infectados com 400 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* no dia 8 de gestação e analisados no dia 15, apresentaram a maioria dos fetos com tamanho menor e pálidos, e também placenta hemorrágicas e menores comparadas aos camundongos não infectados; em paralelo foi observado a diminuição de IL-4 e IL-10 e aumento nos níveis de IFN- γ . Quando tratados com IL-10, 70-80% dos fetos e placenta mostraram um melhor suprimento de sangue e maior tamanho (ZHANG *et al.*, 2012). A infecção de camundongos C57BL/6 com 400 taquizoítos de RH no dia 7 de gestação e analisados 7 dias após mostrou aumento dos níveis de apoptose de células Treg deciduais relacionadas a clivagem das Caspase-3 e Caspase-8, com resultado prejudicial para a gestação, e o tratamento com IL-10 apresentou um efeito reverso melhorando a gestação; e ao contrário, os camundongos IL-10 $^{\text{-/}}$ mostraram regulação positiva dessas moléculas e um pior resultado na gestação (LAO *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram que quando camundongos C57BL/6 ou BALB/c são infectados no dia da detecção da rolha vaginal e examinados no dia 8 de infecção (8dg/8di) ou infectados no final da gestação com a cepa ME-49 por via oral, não foi observado diferenças significantes na detecção de IL-10 nas amostras de soro ou de homogenato dos camundongos. Estes dados indicam que dependendo do dia da infecção e cepa do parasito utilizada para infectar os camundongos, a influência de IL-10 no sucesso da gestação e taxa de nascimento é bastante diferente.

A taxa de incidência e intensidade da infecção congênita são inversamente correlacionados e variam de acordo com o tempo que ocorre a infecção da mãe durante a gestação (BOLLANI; STROCCHIO; STRONATI, 2013). A transmissão vertical de *T. gondii* de mulheres soronegativas infectadas no primeiro trimestre de gestação é incomum, mas as consequências são mais graves (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ,

2012). Isto pode resultar em aborto espontâneo, morte fetal, corioretinite, hidrocefalia e calcificação intracerebral (DUNN *et al.*, 1999). Na verdade, a infecção por *T. gondii* durante o último trimestre de gestação normalmente está associado com uma alta taxa de transmissão para o feto, mas com manifestações clínicas menos grave (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001). Frequentemente, recém-nascidos apresentam infecções subclínicas e desenvolvem alterações oftálmicas tardias ou ainda, crescimento retardado (BOLLANI; STROCCHIO; STRONATI, 2013; CAPOBIANGO *et al.*, 2014). Sendo que o retardado do crescimento fetal também é um efeito colateral da toxoplasmose congênita experimental (ZHAO *et al.*, 2017). Em humanos o crescimento fetal está intimamente relacionado a troca nutricional durante a gestação (MERICQ *et al.*, 2017).

No presente estudo nós examinamos se a glicose é afetada durante a infecção por *T. gondii* na gestação. É conhecido que durante a gestação, a resistência à insulina e, portanto, a hiperglicemia é produzida para garantir o correto suprimento de glicose ao feto; quando mudanças no metabolismo materno de glicose ocorrem, alterações no crescimento fetal são produzidos (LAIN; CATALANO, 2007; MERICQ *et al.*, 2017). Nós não detectamos significantes diferenças nos níveis de glicemia entre os grupos em relação à gestação ou infecção de camundongos C57BL/6, porém uma aparente diminuição da glicemia foi observada no grupo 8di/ng e observamos também um significante acúmulo de células de glicogênio na zona juncional dessa linhagem aos 19dg/5di em relação ao grupo 19dg/ni. De maneira interessante, não observamos mudanças na quantidade e disposição dessas células em camundongos BALB/c. Células de glicogênio são um tipo especializado de trofoblastos similar ao citotrofoblasto extraviloso humano (AKISON *et al.*, 2017; GEORGIADES; FERGUSON-SMITH; BURTON, 2002) e originam-se e proliferam-se na porção superior da região média do cone ectoplacentário (EPC) em grupos agregados a partir do dia E6,5 até o dia E12,5,

exibindo uma aparência vacuolizada clássica contendo glicogênio PAS-positivo (Tesser et al 2010. Elas estão localizadas na camada de espongiotrofoblastos (ADAMSON *et al.*, 2002) e acumulam-se na zona juncional alcançando seu máximo no terço médio da gestação (O'CONNELL *et al.*, 2013; REDLINE *et al.*, 1993). A migração dessas células de glicogênio para a decídua inicia-se no dia E10,5 e é mais proeminente a partir do dia E12,5 além da camada de células gigantes; e no fim da gestação (E17,5) muitas ilhas de células de glicogênio na decídua entram na fase lítica e formam grandes lacunas que estão preenchidas com glicogênio. Isto pode providenciar uma fonte substancial de energia no final da gestação ou durante o parto (BOUILLOT *et al.*, 2006). Mudanças no número de células de glicogênio na placenta, se elas aumentam ou diminuem, têm sido relacionadas com alterações no peso do feto (AKISON *et al.*, 2017). Neste trabalho o alto acúmulo de células de glicogênio na zona juncional da placenta de camundongos C57BL/6 aos 19dg/5di aumentaram essa camada da placenta em detrimento à zona do labirinto, provavelmente comprometendo a correta troca de nutrientes entre a mãe e o feto durante a toxoplasmose congênita e isso poderia resultar em restrição de crescimento intrauterino (IURG) devido ao alterado suprimento de energia. Células de glicogênio são as principais produtoras de fator de crescimento tipo-insulina 2 (Igf2), um importante fator de crescimento que determina o tamanho fetal murino durante a gestação (REDLINE *et al.*, 1993). Nossos resultados da expressão de mRNA mostrou que houve um aumento da expressão de *igf2* em amostras de placenta de camundongos C57BL/6 aos 19dg/5di e em paralelo um aumento de células de glicogênio. Tem sido relatado que um aumento nos níveis de Igf2 em placenta humanas a termo é um mecanismo compensatório em resposta aos fatores que retardam o crescimento e levam à IURG (ABU-AMERO *et al.*, 1998). Quando avaliamos o peso dos fetos de fêmeas C57BL/6 infectadas, observamos que esses não apresentaram uma diminuição no peso em relação aos fetos de mães não infectadas

da mesma linhagem. Isso poderia sugerir que essa linhagem de camundongos responde diferencialmente à infecção pelo parasito, no terceiro terço de gestação, aumentando as células de glicogênio, que poderia estar contribuindo para a nutrição dos fetos e preservando o peso ao nascer.

É conhecido que roedores expressam uma α -quimase, a protease de mastócito murino (mcpt5), e várias β -quimases, incluindo mcpt1, -2 e -4. Enquanto que mcpt4 e -5 são especificamente expressas por mastócitos de tecido conjuntivo, mcpt1 e -2 são encontrados em mastócitos de mucosa (SCANDIUZZI *et al.*, 2010) e nossos resultados mostraram que houve uma diminuição da expressão de mcpt5 aos 8dg/8di em camundongos C57BL/6 em relação aos animais gestantes não infectados, grupo 8dg/ni, mesmo quando encontramos um aumento da quantidade de mastócitos no útero de camundongos dessa linhagem. Alguns autores tem sugerido que haja uma plasticidade no fenótipo de mastócitos a depender de fatores genéticos e do microambiente (GALLI; NAKAE; TSAI, 2005).

8. Conclusão

Em conclusão, nós encontramos que a infecção com *T. gondii* durante o início da gestação leva a um aumento dos níveis sistêmicos e locais de TNF e IL-6 na interface materno fetal de camundongos C57BL/6. Essas citocinas pró-inflamatórias induzem a um excessivo recrutamento de mastócitos ao útero que resulta em prejuízo ao embrião e causa hemorragia, necrose e reabsorção. O aumento de células de glicogênio na placenta de camundongos C57BL/6 parece contribuir para o desenvolvimento normal dos fetos dessa linhagem de camundongos.

Referências

- ABU-AMERO, S. N. et al. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: A comparison between normal and IUGR births. *Molecular Reproduction and Development*, v. 49, n. 3, p. 229-235, 1998.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199803\)49:3<229::AID-MRD2>3.3.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199803)49:3<229::AID-MRD2>3.3.CO;2-H)
- ADAMSON, S. L. et al. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. v. 373, p. 358-373, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)90773-6](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)90773-6)
- AGHAEPOUR, N. et al. An immune clock of human pregnancy. *Science Immunology*, v. 2946, n. September, p. 1-12, 2017.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan2946>
- AKISON, L. K. et al. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*, v. 54, p. 52-58, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.114>
- AL-WARID, H. S.; AL-QADHI, B. N. Evaluation of Progesterone and Estrogen Hormonal Levels in Pregnant Women with Toxoplasmosis. *European Journal of Scientific Research*, v. 91, n. 4, p. 515-519, 2012.
<https://www.researchgate.net/publication/233993325>
- ALEXANDER, J. et al. The role of IL-4 in adult acquired and congenital toxoplasmosis. v. 28, p. 113-120, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00168-9)
- ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*, 2004.
<https://doi.org/10.1038/ni1037>
- ANNES, J. P. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, v. 116, n. 2, p. 217-224, 2003.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00229>
- ARORA, N. et al. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host and Microbe*, v. 21, n. 5, p. 561-567, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>
- BAINBRIDGE, D. R. Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Reviews of reproduction*, v. 5, n. 2, p. 67-74, 2000.
<https://doi.org/10.1530/revreprod/5.2.67>

BARTMANN, C. et al. Quantification of the Predominant Immune Cell Populations in Decidua Throughout Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 71, n. 2, p. 109-119, 2014.
<https://doi.org/10.1111/aji.12185>

BELL, A. W.; EHRHARDT, R. A. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. *Nutrition Research Reviews*, v. 15, n. 2, p. 211, 2002.
<https://doi.org/10.1079/NRR200239>

BENEVIDES, L. et al. CCR2 Receptor Is Essential to Activate Microbicidal Mechanisms to Control *Toxoplasma gondii* Infection in the Central Nervous System. *The American Journal of Pathology*, v. 173, n. 3, p. 741-751, 2008.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080129>

BLADER, I. J.; MANGER, I. D.; BOOTHROYD, J. C. Microarray Analysis Reveals Previously Unknown Changes in *Toxoplasma gondii*-infected Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 24223-24231, 2001.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M100951200>

BLOIS, S. M. et al. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunology*, v. 7, n. 2, p. 348-358, 2014.
<https://doi.org/10.1038/mi.2013.53>

BOLLANI, L.; STROCCHIO, L.; STRONATI, M. Congenital toxoplasmosis. *Early Human Development*, v. 89, n. SUPPL4, p. S70-S72, 2013.
[https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(13\)70107-5](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(13)70107-5)

BORGES, R.; PEDRO, T.; ANDRADE, L. Trophoblast glycogen cells differentiate early in the mouse ectoplacental cone : putative role during placentation. p. 83-92, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s00418-010-0714-x>

BOUILLOT, S. et al. Tracing the Glycogen Cells with Protocadherin 12 During Mouse Placenta Development. *Placenta*, v. 27, n. 8, p. 882-888, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.09.009>

BRETT, K. E. et al. Maternal-Fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: The role of the placenta. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 9, p. 16153-16185, 2014.
<https://doi.org/10.3390/ijms150916153>

BROWN, J. K. et al. Constitutive secretion of the granule chymase mouse mast cell protease-1 and the chemokine, CCL2, by mucosal mast cell homologues. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 33, n. 1, p. 132-141, 2003.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01571.x>

BULFONE-PAUS, S.; BAHRI, R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. AUG, p. 6-11, 2015.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00394>

CAPOBIANGO, J. D. et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 18, n. 4, p. 364-371, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.009>

CASTRO-FILICE, L. S. et al. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. *Journal of Translational Medicine*, v. 12, n. 1, p. 132, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-132>

COCCHIARA, R. et al. A factor secreted by human embryo stimulates cytokine release by uterine mast cell. *Molecular human reproduction*, v. 2, n. 10, p. 781-91, 1996.
<https://doi.org/10.1093/molehr/2.10.781>

CONSTANCIA, M. et al. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 52, p. 19219-19224, 2005.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0504468103>

CONSTÂNCIA, M. et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*, v. 417, n. 6892, p. 945-948, 2002.
<https://doi.org/10.1038/nature00819>

COUTINHO, L. B. et al. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 4, p. 341-352, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.01.006>

CROSS, J.; WERB, Z.; FISHER, S. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, v. 266, n. 5190, p. 1508-1518, 1994.
<https://doi.org/10.1126/science.7985020>

CRUZ, A. et al. Mast cells are crucial in the resistance against *Toxoplasma gondii* oral infection. *European Journal of Immunology*, v. 44, n. 10, p. 2949-2954, 2014.
<https://doi.org/10.1002/eji.201344185>

DA GAMA, L. M. et al. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 14, p. 1287-1296, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.07.008>

DEKEL, N. et al. Inflammation and implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 63, n. 1, p. 17-21, 2010.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00792.x>

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>

DUBEY, J. P. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: In vivo stage conversion and strain variation. *Veterinary Parasitology*, v. 133, n. 4, p. 289-298, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.06.007>

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
<https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUNN, D. et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *Lancet*, v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, 1999.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)

EL-HASHIMI, W. K. et al. The role of cytokines , TNF- α , IL-6 and pregnancy associated hormones in *Toxoplasma gondii* induced abortion. v. 4, n. 6, p. 98-104, 2014.

ERNERUDH, J.; BERG, G.; MJÖSBERG, J. Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, n. SUPPL. 1, p. 31-43, 2011.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01049.x>

FAAS, M. M.; DE VOS, P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*, v. 56, p. 44-52, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.001>

FERREIRA, G. L. S. et al. *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions in vivo and in vitro: Experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Microbes and Infection*, v. 6, n. 2, p. 172-181, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.11.007>

FOWDEN, A. L. et al. The placenta and intrauterine programming. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 20, n. 4, p. 439-450, 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01663.x>

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature Immunology*, v. 6, n. 2, p. 135-142, 2005.
<https://doi.org/10.1038/ni1158>

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host and Microbe*, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>

GAZZINELLI, R. T. et al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 146, p. 286-292, 1991. <http://www.jimmunol.org/content/146/1/286>

GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A C.; BURTON, G. J. CURRENT TOPIC Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human De nitive Placentae. *Placenta*, p. 3-19, 2002.
<https://doi.org/10.1053/plac.2001.0738>

GIL, C. D. et al. Mast cells in the eyes of *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) infected by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, v. 88, n. 6, p. 557-562, 2002.
<https://doi.org/10.1007/s00436-002-0593-8>

HAMPTON, M. M. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Network*, v. 34, n. 5, p. 274-278, 1 set. 2015.
<https://doi.org/10.1891/0730-0832.34.5.274>

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, v. 6, n. 11, p. 1123-1132, 2005.
<https://doi.org/10.1038/ni1254>

HENDERSON, W. R.; CHI, E. Y. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* cytotoxicity. *The Journal of infectious diseases*, v. 177, n. 5, p. 1437-43, 1998.
<https://doi.org/10.1086/517833>

HUANG, B. et al. Mast Cells Modulate Acute Toxoplasmosis in Murine Models. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1-16, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077327>

HUPPERTZ, B. et al. Oxygen as modulator of trophoblast invasion. *Journal of Anatomy*, v. 215, n. 1, p. 14-20, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01036.x>

JENSEN, F. et al. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. PLoS ONE, v. 5, n. 12, p. 1-12, 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014409>

KAMMERER, R.; ZIMMERMANN, W. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. BMC Biology, v. 8, n. 1, p. 12, 2010.

<https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-12>

KITAMURA, Y. Heterogeneity of Mast. Ann Rev. Immunol, n. 8, p. 59-76, 1989.

<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.000423>

KULANDAVELU, S. et al. Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. Hypertension, v. 60, n. 1, p. 231-238, 2012.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187559>

LAIN, K. Y.; CATALANO, P. M. Metabolic Changes in Pregnancy. Clinical Obstetrics and Gynecology, v. 50, n. 4, p. 938-948, 2007.

<https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31815a5494>

LAO, K. et al. Microbial Pathogenesis IL-10 regulate decidual Tregs apoptosis contributing to the abnormal pregnancy with Toxoplasma gondii infection. Microbial Pathogenesis, v. 89, p. 210-216, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.002>

LEE, J. Y.; LEE, M.; LEE, S. K. Role of endometrial immune cells in implantation. Clinical and Experimental Reproductive Medicine, v. 38, n. 3, p. 119-125, 2011.

<https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.3.119>

LIDSTRÖM C., ET AL. Cytokine Secretion Patterns of NK Cells and Macrophages in Early Human Pregnancy Decidua and Blood: Implications for Suppressor Macrophages in Decidua. p. 444-452, 2003.

<https://doi.org/10.1046/j.8755-8920.2003.00112.x>

LYNCH, M. et al. Centers for Disease Control & Prevention (CDC). CDC, v. 55, n. Cdc, p. 1-42, 2000. <http://www.jstor.org/stable/42000708>

MAÎTRE, J. L. Mechanics of blastocyst morphogenesis. Biology of the Cell, v. 109, n. 9, p. 323-338, 2017.

<https://doi.org/10.1111/boc.201700029>

MARX, L.; ARCK, P. Decidual Mast Cells Might Be Involved in the Onset of Human First-Trimester Abortion. American Journal of ..., p. 34-40, 1999.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1999.tb00073.x>

MDL, W. Hemodynamic implications of hemodwwial placentation. n. 1967, p. 67-74, 1975.

[https://doi.org/10.1016/0028-2243\(75\)90131-8](https://doi.org/10.1016/0028-2243(75)90131-8)

MEEUSEN, E. N. T.; BISCHOF, R. J.; LEE, C.-S. Comparative T-Cell Responses During Pregnancy in Large Animals and Humans. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 46, n. 2, p. 169-179, 2001.

<https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2001.460208.x>

MERICQ, V. et al. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 13, n. 1, p. 50-62, 2017.

<https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.127>

MEYER, N.; WOIDACKI, K.; KN??FLER, M.; et al. Chymase-producing cells of the innate immune system are required for decidual vascular remodeling and fetal growth. *Scientific Reports*, v. 7, n. March, p. 1-14, 2017.

<https://doi.org/10.1038/srep45106>

MEYER, N.; WOIDACKI, K.; MAURER, M.; et al. Safeguarding of Fetal Growth by Mast Cells and Natural Killer Cells: Deficiency of One Is Counterbalanced by the Other. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. June, p. 1-10, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00711>

MISIAK-TŁOCZEK, A.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. IL-6, but not IL-4, stimulates chemokinesis and TNF stimulates chemotaxis of tissue mast cells: Involvement of both mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathways. *Apmis*, v. 117, n. 8, p. 558-567, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02518.x>

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Clinical Practice: Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

<https://doi.org/10.1086/590149>

MOORE, T.; DVEKSLER, G. S. Pregnancy-specific glycoproteins: Complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *International Journal of Developmental Biology*, v. 58, n. 2-4, p. 273-280, 2014.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.130329gd>

MORGER, J. et al. Naturally occurring Toll-like receptor 11 (TLR11) and Toll-like receptor 12 (TLR12) polymorphisms are not associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild wood mice. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 26, n. June, p. 180-184, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.032>

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 136, n. 7, p. 2348-57, 1986.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of Toxoplasma gondii. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 269-285, 2011.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>

NASIELL, J. et al. Placental expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in pregnancy complicated by preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v. 77, n. 5, p. 492-496, 1998.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0412.1998.770503.x>

O'CONNELL, B. A. et al. Treatment of pregnant spiny mice at mid gestation with a synthetic glucocorticoid has sex-dependent effects on placental glycogen stores. *Placenta*, v. 34, n. 10, p. 932-940, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.06.310>

ORTIZ-ALEGRÍA, L. B. et al. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes and Immunity*, v. 11, n. 5, p. 363-373, 2010.
<https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>

PIJNENBORG, R.; VERCUYSSSE, L.; HANSSENS, M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*, v. 27, n. 9-10, p. 939-958, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.12.006>

REDLINE, R. W. et al. Differential expression of IGF-II in specific regions of the late (post-day 9.5) murine placenta. *Molec Reprod Devel*, v. 36, p. 121-129, 1993.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080360202>

RIBATTI, D. et al. Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 31, n. 4, p. 602-608, 2001.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.00986.x>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, n. 3, p. 476-488, 2001.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.476-488.2001>

ROBERTSON, S. A. et al. Seminal Fluid and the Generation of Regulatory T Cells for Embryo Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 69, n. 4, p. 315-330, 2013.
<https://doi.org/10.1111/aji.12107>

ROOS, S. et al. Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling. American journal of physiology. Cell physiology, v. 297, p. 723-731, 2009.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00191.2009>

SAKAGUCHI, S. NATURALLY ARISING CD4+ REGULATORY TCELLS FOR IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE AND NEGATIVE CONTROL OF IMMUNE RESPONSES. Annual Review of Immunology, v. 22, n. 1, p. 531-562, 2004.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>

SCANDIUZZI, L. et al. Mouse Mast Cell Protease-4 Deteriorates Renal Function by Contributing to Inflammation and Fibrosis in Immune Complex-Mediated Glomerulonephritis. The Journal of Immunology, v. 185, n. 1, p. 624-633, 2010.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902129>

SCHJENKEN, J.; TOLOSA, J. Mechanisms of maternal immune tolerance during pregnancy. Recent Advances in Research on the Human Placenta, p. 1-33, 2012.

SCHUMACHER, A.; COSTA, S. D.; ZENCLUSSEN, A. C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. Frontiers in Immunology, v. 5, n. MAY, p. 1-13, 2014.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00196>

SENEGAS, A. et al. Toxoplasma gondii- induced foetal resorption in mice involves interferon- c -induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofoetal interface. International Journal for Parasitology, v. 39, n. 4, p. 481-487, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.009>

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. Journal of Physiology, v. 589, n. 1, p. 7-20, 2011.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.198622>

SHI, M. et al. Latent TGF- β structure and activation. Nature, v. 474, n. 7351, p. 343-349, 2011.
<https://doi.org/10.1038/nature10152>

SHIONO, Y. et al. Maternal - fetal transmission of Toxoplasma gondii in interferon- γ deficient pregnant mice. v. 56, p. 141-148, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.01.008>

SIBLEY, C. P. et al. Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 21, p. 8204-8208, 2004.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402508101>

SILVEIRA, C. et al. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 Years earlier. American Journal of Ophthalmology, v. 136, n. 2, p. 370-371, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(03)00191-0)

SIVRIDIS, E. et al. Mast cell distribution and density in the normal uterus--metachromatic staining using lectins. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, v. 98, n. 1, p. 109-13, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(00\)00564-9](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00564-9)

SOMERSET, D. A. et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25 + CD4 + regulatory T-cell subset. Immunology, 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x>

STUTZ, A. et al. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii. Immunobiology, v. 217, n. 1, p. 28-36, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.08.008>

SVENSSON-ARVELUND, J.; ERNERUDH, J. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. American Journal of Reproductive Immunology, v. 74, n. 2, p. 100-109, 2015.
<https://doi.org/10.1111/aji.12357>

SVENSSON, J. et al. Macrophages at the Fetal-Maternal Interface Express Markers of Alternative Activation and Are Induced by M-CSF and IL-10. The Journal of Immunology, v. 187, n. 7, p. 3671-3682, 2011.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100130>

SZEWCZYK, G. et al. Histamine stimulates alphav-beta3 integrin expression of the human trophoblast through the H(1) receptor. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.], v. 55 Suppl 1, p. S79-80, 2006.
<https://doi.org/10.1007/s00011-005-0052-y>

SZUKIEWICZ, D. et al. Mast cell number, histamine concentration and placental vascular response to histamine in preeclampsia. Inflamm Res, v. 48 Suppl 1, p. S39-40, 1999.
<https://doi.org/10.1007/s000110050390>

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bulletin of the World Health Organization, v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013.
<https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>

WARNING, J. C.; MCCRACKEN, S. A.; MORRIS, J. M. A balancing act: Mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. Reproduction, v. 141, n. 6, p. 715-724, 2011.
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0360>

WILSON, C. B. et al. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection. *Pediatrics*, v. 66, n. 5, p. 767-74, nov. 1980.

WOHLFERT, E. A.; BLADER, I. J.; WILSON, E. H. Brains and Brawn: Toxoplasma Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. *Trends in Parasitology*, v. xx, p. 1-13, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.001>

WOIDACKI, K.; JENSEN, F.; ZENCLUSSEN, A. C. Mast cells as novel mediators of reproductive processes. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. FRB, p. 1-6, 2013.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00029>

WU, G.; IMHOFF-KUNSCH, B.; GIRARD, A. W. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, v. 26, n. SUPPL. 1, p. 4-26, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2012.01291.x>

ZENCLUSSEN, A. C. et al. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. *Cytokine*, v. 24, n. 4, p. 150-160, 2003.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.08.002>

ZENCLUSSEN, A. C. et al. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *European Journal of Immunology*, v. 36, n. 1, p. 82-94, 2006.

<https://doi.org/10.1002/eji.200535428>

ZHANG, R. et al. The Immunoprotective Role of Interleukin-10 in Abnormal Pregnancy Outcome Induced by Toxoplasma gondii Infection. v. 264003, p. 223-229, 2012.

<https://doi.org/10.1159/000333310>

ZHAO, M. et al. The effect of TGF- β on treg cells in adverse pregnancy outcome upon toxoplasma gondii infection. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. MAY, p. 1-10, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00901>

Anexos



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

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

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

Pesquisador Responsável: Profa. Dra Neide Maria da Silva

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

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

Uberlândia, 13 de Junho de 2012

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