

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

A função do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF)
no controle da infecção por *Toxoplasma gondii* em células
trofoblásticas é dependente da idade gestacional

Angelica de Oliveira Gomes

Uberlândia
Abril – 2013

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

**A função do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF)
no controle da infecção por *Toxoplasma gondii* em células
trofoblásticas é dependente da idade gestacional**

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

Doutoranda: Angelica de Oliveira Gomes

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia
Abril -2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

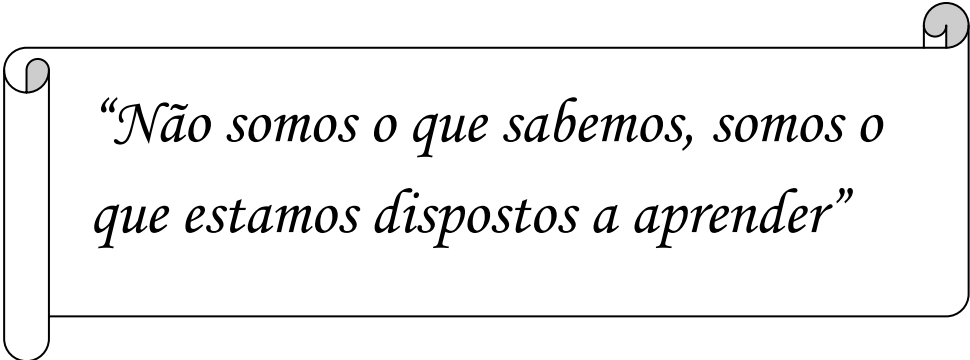
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- G633f
2013 Gomes, Angelica de Oliveira, 1982-
A função do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) no controle da infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas é dependente da idade gestacional / Angelica de Oliveira Gomes. – 2013. 115 p. : il.
- Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Macrófagos - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família: meus pais Carlos Roberto e Veronice, minhas irmãs Christiane e Carla e ao meu querido sobrinho Nicolas. Com vocês eu aprendo todos os dias os valores mais importantes da vida! De vocês eu recebo o amor, a força e o incentivo que preciso para viver e para lutar! Com vocês eu divido minhas alegrias, minhas angústias, minhas derrotas e minhas conquistas! Com vocês eu compartilho a alegria da conclusão deste trabalho. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!



*“Não somos o que sabemos, somos o
que estamos dispostos a aprender”*

Agradecimentos:

Momento de agradecer... neste momento tão especial posso lembrar de quantas pessoas passaram por minha vida nestes quatro anos de doutorado... foram tantas pessoas, tantos momentos que seriam impossível agradecer a todos com tão poucas palavras... Muito obrigada a todos que fizeram parte desta importante etapa de minha vida, que colaboram para o meu crescimento e para a conquista desta grande vitória!

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela oportunidade de aprender, por guiar meus passos e por colocar sempre pessoas tão especiais em meu caminho tornando minha caminhada mais fácil e agradável...

À minha orientadora Eloisa Amália Vieira Ferro por quase 10 anos de orientação! Tenho milhares de motivos para dizer: Muito obrigada! Obrigada por ter me acolhido no laboratório de Histologia e permitido que tantas outras portas se abrissem pra mim! Obrigada pelo carinho, pela amizade, pela presença infalível! Obrigada pela confiança que muito me fez crescer! Obrigada pelo privilégio de trabalhar em seu grupo de pesquisa! Obrigada por ter me apresentado a interface materno-fetal e confiado a mim um projeto de tamanha beleza!

Ao professor José Roberto Mineo meu eterno agradecimento e admiração! Obrigada pela participação fundamental em minha formação! Nunca me esquecerei de suas aulas brilhantes; de sua inteligência e poder de argumentação nas reuniões de submissão de artigos e da sua presença infalível em inúmeros momentos de minha formação! Obrigada por ter incentivado, orientado e participado de cada etapa para a conquista do doutorado sanduíche! Muito obrigada por tudo!

À Deise Aparecida de Oliveira Silva, pessoa tão querida que me acolheu com tão carinho no laboratório de Imunologia. Obrigada pela disposição e boa vontade de ensinar e ajudar! Obrigada você, que é referência de vida profissional e pessoal, por fazer parte de minha formação! Aprendi com você o quanto é muito importante gostarmos do que fazemos!

A cada professor do laboratório de histologia! À professora Neide Maria da Silva pelo carinho e amizade; pela postura de compromisso e dedicação; pela oportunidade de trabalhar com sua equipe! Obrigada por sua participação tão importante em minha formação! À professora Karen Renata Nakamura Hiraki muito obrigada pela amizade, pela torcida, pelos incentivos, dicas e pelas conversas tão agradáveis! E a

todos os outros professores que ao longo desta caminhada contribuíram para minha formação!

Ao professor Tiago Wilson Patriarca Mineo, obrigada pela participação financeira e intelectual neste trabalho e por intermediar a obtenção dos animais MIF nocaute!

Às amigas da Histologia: Bellisa, Mariana, Letícia, Celene, Karine, Priscila, Andressa, Mayara, Janice, Pâmela, Rafaela, Alessandra! Obrigada por todos os momentos que passamos juntas, por dividirmos alegrias, angústias, trabalhos, conhecimentos e diversão! Obrigada pelo carinho e amizade, pela companhia tão agradável! Tenho grande orgulho em dizer que somos uma equipe! Obrigada pela ajuda de cada uma de vocês na realização deste trabalho... Sem a ajuda de vocês eu estaria macerando vilos até hoje... Muito obrigada Bellisa, Priscila e Mayara por termos realizados juntas cada etapa do trabalho com os camundongos! Muito obrigada Karine pela ajuda fundamental nas reações de Western blotting e CBA!

Aos funcionários do laboratório de Histologia: Juscélia, Fabrício, Mariane, Eliete, Ester e Rosiane muito obrigada pelo carinho, amizade e pela disposição em ajudar sempre que for preciso!

Aos alunos da professora Neide em especial à Loyane, Ester, Paulo Vitor, Rômulo, Layane, obrigada pela amizade, pela companhia e pela disponibilidade em ajudar e pela oportunidade e trabalhamos juntos!

Obrigada a toda a equipe da maternidade do hospital de Clínicas da UFU, em especial à Dra Maria Célia dos Santos que permitiu que esta parceria tão importante fosse estabelecida. A cada pessoa que permitiu que este trabalho fosse realizado: Alderi, Mary Ângela, Emília, Marilac (com carinho especial) e inúmeras outras pessoas representadas pelos poucos nomes citados. Sem a boa vontade que cada uma de vocês este trabalho não seria possível.

“Às mães das placentas”, obrigada por compreender e ceder parte de vocês para a realização deste trabalho. MUITÍSSIMO obrigada!

Às secretários da pós graduação Lucileide e Lucélia muito obrigada pelo carinho, atenção e boa vontade com que recebem e atendem a cada aluno.

Ao Professor Vernon B. Carruthers que me abriu as portas de seu laboratório permitindo a realização do meu sonho do doutorado sanduíche. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos de postura, seriedade e compromisso com a pesquisa. Obrigada por ter sido sempre tão gentil e simpático e por ter permitido a minha participação em um projeto tão importante! Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com a sua equipe composta por pessoas tão especiais como Mae, Marijo, Zhicheng, Tracey, Nadya, Ou, Raji e Swati. Muito obrigada por ter colocado Swati Agrawal em meu caminho! Esta pessoa que se tornou uma amiga tão especial não mediu esforços em ajudar, ensinar, orientar. A cada um de vocês minha eterna gratidão e meus sinceros desejos de boa sorte, alegrias e realizações! Saudades de todos vocês!

A minha família: vovôs e vovós, tios e tias, primos e primas, a todos vocês que fazem parte de minha vida muito obrigada pelo berço de amor e união. Obrigada pelo apoio nos momentos que mais precisei. Obrigada pela confiança, pela torcida e pela força. Amo vocês!

Ao meu namorado Edson pelo amor incondicional, por entender meus momentos de ausência, por apoiar minhas decisões, por ser meu companheiro de todas as horas, por me deixar saber que posso sempre contar contigo, sempre!

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro!

LISTA DE ABREVIATURAS:

- AA: ácido araquidônico
- ABC: complexo streptavidina, biotina
- AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
- APCs: células apresentadoras de antígenos
- ATF-2: fator de ativação de transcrição-2
- CBA: cytometric beads array
- CBEA: Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
- CD: *cluster of differentiation*
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais
- COX: ciclooxigenase
- cPLA2: fosfolipase citoplasmática A2
- CPRG: Clorofenol Vermelho β -D-galactopiranosídeo
- CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo- monofosfato de adenosina cíclica
- DC: células dendríticas
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- dNTP: *deoxyribonucleotide triphosphates*
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
- ERKs: quinases relacionadas com a ativação do sinal extracelular
- FACS: citometria de fluxo
- FOXP3+: *forkhead box P3*
- GTP: trifosfato de guanosina
- H₃PO₄: ácido fosfórico
- HIV: vírus da Imunodeficiência Humana
- HRP: *Horseradish* peroxidase
- ICAM: Molécula de adesão intracelular
- IDO: indoleamina 2,3 dioxigenase
- IFN- γ : interferon gamma
- IFN γ R2: receptor de IFN γ tipo 2
- IgG: imunoglobulina G
- IKB: inibidor kappa B
- IL: interleucina
- iNOS: óxido nítrico sintase induzida
- IRAK: quinase associada ao receptor IL-1
- JNK: c-Jun N-terminal quinase
- Ko: nocaute
- MAPk: proteínas quinases ativadas por mitógenos
- MCP-1: proteína-1 quimiotática para monócitos
- MgCl₂: cloreto de magnésio
- MHC: complexo principal de histocompatibilidade
- MICs: proteínas de micronemas
- MIF: fator de inibição da migração de macrófagos
- MJ: junções de movimento
- MyD88: proteína 88 da resposta primária de diferenciação mielóide
- NaCl: cloreto de sódio

- NEED: dicloridrato de n(1-naftil)-etilenodiamina
- NF- κ B: fator nuclear kappa B
- NK: *natural killer*
- NO: óxido nítrico
- NOS: óxido nítrico sintase
- NP/I: não prenhes e infectadas (08 dias de infecção)
- NP/NI: não prenhes e não infectadas
- P/I: prenhes e infectadas (08 dias de infecção)
- P/NI: prenhes e não infectadas
- P38 MAPk: proteínas quinases ativadas por mitógenos
- PBS: *Phosphate-buffered saline* (tampão fosfato)
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- PE: ficoeritrina
- PGE2: prostaglandina E2
- PVDF: *Polyvinylidene fluoride*
- PVM: membrana do vacúolo parasitóforo
- RIPA: tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
- RNA: ácido ribonucléico
- ROI: reativos intermediários de oxigênio
- RON: proteínas da região afilada das roptrias
- ROPs: proteínas de roptrias
- ROS: espécies reativos de oxigênio
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
- SAPK: proteínas quinases ativadas pelo estresse
- SBF: soro bovino fetal
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- STAg: antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*
- STAT-3: via de transdução de sinal e ativação de transcrição 3
- *T. gondii* = *Toxoplasma gondii*
- TA: temperatura ambiente
- TBS: Tris buffered saline (tampão Tris)
- TGF β : fator de crescimento tumoral beta
- TLR: *toll like receptors*
- TMB: 3'3'-5'5 tetrametilbenzidina
- TNF: Fator de necrose tumoral
- Treg: células T reguladoras
- Trp: triptofano
- UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro
- UFU: Universidade Federal de Uberlândia
- VP: vacúolo parasitóforo
- WB: *western blotting*
- WT: *wild type* (tipo selvagem)

SUMÁRIO:

RESUMO:	10
ABSTRACT:	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e a toxoplasmose	15
1.1.1. Biologia do parasito	15
1.1.2. Ciclo de vida	16
1.1.3. Mecanismos de invasão celular	17
1.1.4. Resposta Imunológica ao <i>T. gondii</i>	19
1.1.5. Sinalização intracelular envolvida na resposta imune inata	22
1.1.6. Modulação da resposta imunológica por <i>T. gondii</i>	23
1.1.7. Influência de hormônios na infecção parasitária	25
1.2. A Toxoplasmose congênita	26
1.3. Fator de Inibição de Macrófagos (MIF) na gestação e na infecção parasitária	27
1.4. MIF e Toxoplasmose	29
1.5. Modos de ação de MIF	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS:	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos:	33
3.2.1. Experimentos <i>in vitro</i>	33
3.2.2. Experimentos <i>in vivo</i>	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	35
4.1.1. Submissão e aprovação do Comitê de Ética	35
4.1.2. Cultivo de explantes de vilos coriônicos de placenta humana	35
4.1.3. Parasitos	36
4.1.4. Tratamento e infecção dos explantes de vilos placentários humanos	36
4.1.5. Determinação da concentração protéica dos vilos coriônicos	37
4.1.6. Mensuração NO	37
4.1.7. Dosagem de citocinas	38
4.1.8. Imuno-histoquímica	38
4.1.9. Quantificação do parasitismo por PCR em tempo real	40

4.1.10.	Quantificação do parasitismo por imuno-histoquímica	40
4.1.11.	Quantificação do parasitismo por reação enzimática	41
4.1.12.	Quantificação de CD74 por PCR em tempo real	41
4.1.13.	Western blotting	42
4.1.14.	Análise estatística	43
4.2.	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	44
4.2.1.	Submissão e aprovação do Comitê de Ética	44
4.2.2.	Obtenção dos animais	44
4.2.3.	Infecção experimental	44
4.2.4.	Análise de Morbidade	44
4.2.5.	Acasalamento e detecção de prenhez	45
4.2.6.	Sacrifício e coleta de material	45
4.2.7.	Quantificação protéica e reações de <i>western blotting</i>	46
4.2.8.	Quantificação de citocinas por citometria de fluxo (<i>Cytometric Bead Array</i> – CBA)	47
4.2.9.	Dosagem de óxido nítrico	47
4.2.10.	Análise estatística	48
4.2.11.	Normas de biossegurança	48
5.	RESULTADOS	49
5.1.	RESULTADOS OBTIDOS DE EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	49
5.1.1.	Expressão de CD74 em explantes placentários	49
5.1.2.	Liberação de MIF por explantes placentários	49
5.1.3.	Expressão de MIF por explantes placentários	50
5.1.4.	Efeito de MIF no controle da infecção	50
5.1.5.	Produção de Nitrito	52
5.1.6.	Modelo proposto para controle da infecção por <i>T. gondii</i> dependente de MIF em explantes de placenta	52
5.1.7.	A sinalização das MAPK em explantes placentários é dependente da idade gestacional e independente da atividade de MIF	53
5.1.8.	Imunolocalização da Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO) em explantes de placenta de primeiro e terceiro trimestre de gestação	56
5.2.	RESULTADOS OBTIDOS DE EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	56
5.2.1.	CAMUNDONGOS MIF ^{-/-} APRESENTAM MAIOR MORBIDADE EM COMPARAÇÃO AO CONTROLE SELVAGEM	56
5.2.2.	A EXPRESSÃO DE IDO É MAIS INTENSA EM ANIMAIS MIF ^{-/-} EM COMPARAÇÃO COM AO CONTROLE SELVAGEM	57

5.2.3. A EXPRESSÃO DE COX-2 É MENOS INTENSA EM ANIMAIS MIF ^{-/-} EM COMPARAÇÃO COM AO CONTROLE SELVAGEM	58
5.2.4. A RESPOSTA DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS FRENTE À INFECÇÃO É ALTERADA EM ANIMAIS MIF ^{-/-} EM COMPARAÇÃO AO CONTROLE SELVAGEM	58
5.2.5. A PRODUÇÃO DE NO EM ANIMAIS MIF ^{-/-} NÃO SOFRE ALTERAÇÕES QUANDO COMPARADA AOS ANIMAIS CONTROLE TIPO SELVAGEM	60
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO:	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	77
9. ANEXOS:	95
9.1. ANEXO I.....	95
9.2. ANEXO II	96
10. FIGURAS	13
FIGURA 1	13
FIGURA 2:.....	13
FIGURA 3:.....	12
FIGURA 4:.....	13
FIGURA 5:.....	13
FIGURA 6:.....	13
Figura 7	13
Figura 8	13
Figura 9	13
Figura 10	13
Figura 11	13
Figura 12	13
Figura 13.....	13
Figura 14.....	13
Figura 15.....	13
Figura 16.....	13
Figura 17	13

RESUMO:

Objetivos: Considerando o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) uma citocina chave para a gestação, que apresenta importante resposta inflamatória e participa na defesa contra patógenos, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de MIF em explantes de placenta humana de primeiro e terceiro trimestres de gestação infectados com *Toxoplasma gondii*; assim como investigar os mecanismos de ação de MIF na interface materno-fetal. **Metodologia:** Para um estudo *in vitro*, explantes de placenta humana foram tratados com MIF, IL-12, interferon- γ , fator de crescimento tumoral- β 1, ou IL-10, seguido pela infecção com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Sobrenadantes de cultura de explantes foram utilizados para a análise de citocinas por ELISA. Explantes foram processados para análise morfológica, imunohistoquímica, PCR em tempo real e *western blotting*. Além disso, para estudo *in vivo*, fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} e C57BL/6 WT foram oralmente infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii* no primeiro dia de prenhez e sacrificadas no 8º dia de prenhez e infecção. Os controles foram realizados com fêmeas não-prenhes e/ou não infectadas. Úteros foram avaliados por *western blotting* e as citocinas foram analisadas no soro destes animais por CBA. **Resultados:** A comparação de explantes de placenta humana infectados e estimulados com explantes controle (não infectados e não estimulados) demonstrou um aumento significativo na liberação de MIF em explantes de primeiro trimestre, mas não em explantes de terceiro trimestre. O parasitismo tecidual foi maior em explantes de primeiro que explantes de terceiro trimestre. Além disso, o conteúdo de DNA de *T. gondii* foi menor em explantes de placenta de primeiro trimestre tratados com MIF se comparado aos explantes não tratados. Entretanto, em explantes de terceiro trimestre, o estímulo com MIF reduziu o conteúdo de DNA de *T. gondii* apenas na maior concentração de MIF. Além disso, a expressão do receptor de MIF foi maior em explantes de primeiro que de terceiro trimestre de gestação. Experimentos *in vivo* demonstraram que C57BL/6 MIF^{-/-} apresentaram alta expressão de IDO e baixa expressão de COX-2 em tecidos uterinos e um aumento na liberação de citocinas de perfil Th2 em resposta à infecção associada à gestação. Por outro lado, camundongos C57BL/6 tipo selvagem apresentaram baixa expressão de IDO e alta expressão de COX-2 em tecidos uterinos e um aumento na liberação de citocinas de perfil Th1 em resposta à infecção associada à gestação. **Conclusão:** MIF foi positivamente regulada e demonstrou ser importante para o controle da infecção por *T. gondii* em explantes de primeiro trimestre, enquanto que a falta de regulação positiva para MIF em placentas de terceiro trimestre pode estar envolvida com os maiores índices de infecção observados nesta idade gestacional. Os mecanismos de ação de MIF na interface materno-fetal podem estar associados à supressão da IDO e indução de uma resposta imunológica de perfil pró-inflamatório.

Palavras chave: placenta, útero, MIF, *T. gondii*

ABSTRACT:

Objectives: Because macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a key cytokine in pregnancy and has a role in inflammatory response and pathogen defense, the objective of the present study was to investigate the effects of MIF in first- and third-trimester human placental explants infected with *Toxoplasma gondii*; as well as to find up the mechanisms of MIF action. **Methodology:** For in vitro assay human explants were treated with recombinant MIF, IL-12, interferon- γ , transforming growth factor- β 1, or IL-10, followed by infection with *T. gondii* RH strain tachyzoites. Supernatants of cultured explants were assessed for cytokines by ELISA. Explants were processed for morphologic analysis, immunohistochemistry, real-time PCR analysis and western blotting. In addition, for in vivo assay C57BL/6 MIF^{-/-} and C57BL/6 WT females were orally infected with *T. gondii* ME-49 strain on day 1 of pregnancy and were sacrificed on day 8 post infection. The controls were set up with non pregnant or/and non infected mice. The uteri were evaluated by western blotting analyses and cytokines were assed in serum by CBA assay. **Results:** Comparison of infected and stimulated explants versus noninfected control explants demonstrated a significant increase in MIF release in first-trimester but not third-trimester explants. Tissue parasitism was higher in third- than in first-trimester explants. Moreover, *T. gondii* DNA content was lower in first-trimester explants treated with MIF compared with untreated explants. However, in third-trimester explants, MIF stimulus decreased *T. gondii* DNA content only at the highest concentration of the cytokine. In addition, high expression of MIF receptor was observed in first-trimester placental explants, whereas MIF receptor expression was low in third-trimester explants. In vivo assay demonstrated that the C57BL/6 MIF^{-/-} presented high IDO and low COX-2 expression in the uteri and an increased release on cytokines of Th2 profile in response to infection associated with pregnancy. On the other hand C57BL/6 WT presented low IDO and high COX-2 expression in the uteri and an increased release on cytokines of Th1 profile in response to infection associated with pregnancy. **Conclusion:** MIF was up-regulated and demonstrated to be important for control of *T. gondii* infection in first-trimester explants, whereas lack of MIF up-regulation in third-trimester placentas may be involved in higher susceptibility to infection at this gestational age. The mechanism of MIF action in the maternal-fetal interface may be related with suppression of IDO and induction of pro-inflammatory immune response.

Key words: placenta, uterus, MIF, *T. gondii*

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii* e a toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, bem sucedido e adaptado aos seus organismos hospedeiros. Pertence ao filo Apicomplexa, embora possua uma característica não usual dentro do grupo que é a capacidade de parasitar uma enorme variedade de tipos celulares. Este parasito é capaz de infectar humanos, assim como quaisquer animais de sangue quente, incluindo aves e mamíferos. *T. gondii* apresenta elevada soroprevalência na população humana, sendo aproximadamente 25 a 30% da população mundial infectada por *T. gondii* (MONTROYA, LIENSENFELD, 2004). Entretanto, a prevalência varia muito entre diferentes países (10 a 80%) e regiões. Baixas soroprevalências (10 a 30%) foram observadas na América do Norte, sudoeste asiático, norte da Europa. Prevalência moderada (30 a 50%) foi demonstrada em países da região central e sul da Europa e alta prevalência foi reportada na América Latina e países da África (PAPPAS et al., 2009).

Em indivíduos adultos imunocompetentes a manifestação clínica da doença não é muito comum. Aproximadamente, 80% dos indivíduos com toxoplasmose são assintomáticos. Entretanto, significantes números de manifestações oculares e casos de linfadenopatia são registrados mundialmente todos os anos. Indivíduos imunocomprometidos (ex: pacientes com AIDS ou pacientes sob o uso de medicamentos imunossupressores como no caso de pacientes com câncer ou pacientes transplantados) infectados com *T. gondii* possuem alto risco de desenvolver encefalite devido à reativação de bradizoítas ao estágio de taquizoítas, provocando resposta inflamatória grave (KASPER, BUZONI-GATEL, 1998; MILLER, et al.; 2009).

1.1.1. Biologia do parasito

Existem três estágios de vida infectantes de *T. gondii*: um estágio de multiplicação rápida que compreende os taquizoítas altamente invasivos, um estágio de divisão lenta que inclui os bradizoítas dentro dos cistos teciduais e, finalmente, um estágio de desenvolvimento no ambiente que abrange os

esporozoítas que estão protegidos dentro dos oocistos (DUBEY, 1986; ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

Os taquizoítas ou estágio infectante são a forma de disseminação de *T. gondii*. Morfologicamente, os taquizoítas caracterizam-se pelo formato de arco, com aproximadamente 5µm de comprimento e 2µm de espessura. Possuem uma extremidade apical afilada e a extremidade posterior abaulada. Os taquizoítas são delimitados por uma membrana intimamente associada ao citoesqueleto. Este por sua vez possibilita a integridade estrutural e a motilidade do parasito. Além das organelas comuns dos seres eucariontes os taquizoítas de *T. gondii* apresentam uma organela chamada apicoplasto que representa uma possível origem evolutiva a partir de um processo de endossimbiose com algas vermelhas de vida livre (ROSS, et al., 1999). Os taquizoítas apresentam ainda organelas que são características do filo *Apicomplexa*: o conóide (que é uma estrutura envolvida na invasão celular) e numerosas organelas secretoras (roptrias [ROPs], grânulos densos e micronemas).

Os bradizoítas resultam da conversão de taquizoítas em um estágio de multiplicação lenta formando os cistos teciduais. Este estágio de vida é caracterizado por um metabolismo latente consistente com a sobrevivência de longa duração dos bradizoítas. A parede dos cistos consiste de uma membrana limitante apresentando numerosas invaginações. Esta parede membranosa confere resistência dos bradizoítas à pepsina ácida do estômago que permite a transmissão de bradizoítas por meio de ingestão (FERGUSON, 2004).

Já os esporozoítas estão localizados dentro de oocistos maduros. Os oocistos são estruturas ovóides que após esporulação contém dois esporocistos cada um contendo quatro esporozóitas. A parede dos oocistos é uma estrutura robusta de múltiplas camadas que protege os parasitos de danos químicos e mecânicos. Esta adaptação permite sobrevivência do parasito por longos períodos, mais de um ano, em ambientes úmidos (MAI et al., 2009).

1.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. gondii* é constituído de fases sexuada e assexuada, sendo que a fase sexuada somente ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, os felinos. Desta forma, a infecção por *T. gondii* em humanos é geralmente iniciada

pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos liberados nas fezes de felídeos infectados. No hospedeiro intermediário, os esporozoítas são liberados dos oocistos, eles penetram diversos tipos celulares e multiplicam assexuadamente, na forma de taquizoítas. Estes parasitos disseminam de forma eficaz pelos órgãos do hospedeiro intermediário através da circulação sanguínea (DUBEY, 1986).

Por fim, devido à pressão do sistema imunológico, os parasitos formam cistos, contendo a forma de replicação lenta de *T. gondii*, os bradizoítas. Estes se formam principalmente em tecidos musculares e cerebrais dos hospedeiros intermediários. A presença de cistos teciduais representa outra importante fonte de transmissão de *T. gondii* que ocorre pela ingestão destes cistos em tecidos dos hospedeiros intermediários (DUBEY, 1986). Após a ingestão, os cistos passam pelo trato digestório causando a liberação de bradizoítas. Os bradizoítas irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro e diferenciar novamente em taquizoítas que são o estágio de disseminação pelo corpo (DUBEY, 1986; ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

1.1.3. Mecanismos de invasão celular

A infecção por *T. gondii* envolve uma série de interações e respostas coordenadas entre parasito e hospedeiro (DENKERS et al, 2004). O primeiro passo da infecção é a invasão da célula hospedeira por *T. gondii*. Este processo é rápido (aproximadamente 30 segundos), dinâmico, complexo e envolve a secreção de numerosas proteínas provenientes de organelas especializadas que são: micronemas, roptrias e grânulos densos. Estudos revelam que a secreção sequencial de proteínas do parasito são eventos críticos para a invasão e estabelecimento da infecção (LERICHE, DUBREMETZ, 1990; CARRUTHERS, SIBLEY, 1997, BECK et al, 2013).

As micronemas são as primeiras organelas que secretam seus conteúdos que incluem as proteínas MICs, que são liberadas logo após ocorrer ligação da porção apical do parasito à célula hospedeira. Estas proteínas conferem a fixação e penetração do parasito (TOMLEY, SOLDATI, 2001). Subseqüentemente, as proteínas das roptrias são secretadas. Estas proteínas são importantes para a biogênese do vacúolo parasitóforo (VP) e para a interação com as organelas da célula hospedeira (SINAI, et al, 1997; NAKAAR, et al, 2003).

Proteínas da região afiladas das roptrias (RONs) juntam-se às MICs para formar as junções de movimento (MJ) que é um arranjo complexo de proteínas (ALEXANDER, et al., 2005; LEBRUN et al., 2005). As MJs promovem a justaposição da membrana plasmática do parasito e da célula hospedeira que são importantes para a formação da membrana do vacúolo parasitóforo (PVM). Neste momento, as proteínas da porção bulbar das roptrias (ROPs) são introduzidas na célula hospedeira dentro de pequenas vesículas que posteriormente irão fundir com o VP (HAKANSSON, et al, 2001).

Finalmente, proteínas dos grânulos densos são exocitadas durante e após o processo de invasão e participam da função intracelular de sobrevivência e replicação do parasito (CAREY, et al., 2000; MERCIER, et al., 2002; NEUDECK, et al., 2002). Estudos sugerem que os produtos liberados pelo parasito são capazes de manipular a resposta imunológica do hospedeiro favorecendo o processo de replicação intracelular do parasito (ALIBERTI et al, 2003, POLLARD et al., 2009).

Durante dois ou três dias o parasito conduzirá ciclos de replicação e finalmente estará pronto para causar lise da célula hospedeira, preparando-se para uma nova jornada de infecções. Entretanto, a saída do parasito da célula hospedeira pode ser conduzida em estágios iniciais da infecção independente de lise celular. Esta estratégia permite ao parasito sair rapidamente de uma célula e realizar movimentos tipo “gliding” para mover-se no substrato e alcançar a célula adjacente de forma imediata. Desta forma, o parasito minimiza a exposição de antígenos ao microambiente extracelular e evita a atuação de mediadores do sistema imunológico do hospedeiro (HOFF, CARRUTHRS, 2002; KAFSACK et al, 2009).

Uma vez que a infecção por *T. gondii* foi estabelecida, iniciam-se uma série de interações e respostas coordenadas entre o parasito e o hospedeiro (DENKERS et al, 2004). Assim, o sucesso da infecção por *T. gondii* é dependente de um delicado balanço entre a resposta imunológica do hospedeiro, que tenta eliminar o parasito, e as estratégias de evasão ou imunomodulação que são desempenhadas pelo parasito. O balanço desta interação possibilita sobrevivência de ambos: o parasito e o hospedeiro, que evolutivamente é caracterizada como uma interação de sucesso (TENTER, HECKEROTH, WEISS, 2000). Portanto, uma interação de sucesso começa com um hospedeiro imunologicamente competente. Uma vez que o parasito é percebido pelo sistema imunológico ocorre uma resposta imunológica

capaz de controlar a infecção e assim, permitir uma interação de longa duração (DENKERS, et al.; 2004).

1.1.4. Resposta Imunológica ao *T. gondii*

Uma vez que *T. gondii* é detectado pelo sistema imunológico inicia-se resposta protetora capaz de controlar a replicação do parasito e permitir a sobrevivência do hospedeiro. A fase aguda da infecção é caracterizada pelo recrutamento de células dendríticas (DC), neutrófilos e monócitos para os sítios de invasão do parasito. Estas células atuam como fonte de IL-12 que por sua vez estimulam a secreção de interferon-gamma (IFN- γ) por células da imunidade inata (GAZZINELLI et al, 1994; HUNTER et al., 1994; DENKERS, GAZZINELLI, 1998; CAI et al., 2000; DENKERS et al., 2004). O efeito combinado de IL-12 e IFN- γ medeia um papel central na resistência ao *T. gondii*. Estas citocinas são capazes de iniciar uma forte resposta adaptativa do tipo T *helper*-1 (Th1) mediada por células TCD4+ e TCD8+, que continuam produzindo altos níveis de IL-12 e IFN- γ . O efeito pro-inflamatório destas citocinas inclui a produção de moléculas microbidas, óxido nítrico (NO), dentre outros (GAZZINELLI et al., 1992; HUNTER et al., 1997; YAP, SHER, 1999). Uma vez desencadeada a resposta adaptativa torna-se favorável a sobrevivência do hospedeiro e a proteção contra re-infecções. Um exemplo deste processo é a transição do estágio de taquizóitas (replicação rápida) para bradizoítas (replicação lenta), os quais formam os cistos teciduais, que correm preferencialmente nos tecidos musculares e nervosos estabelecendo-se a fase crônica da infecção. Durante esta fase, células T e IFN- γ são fatores requeridos para prevenir a recrudescência da infecção (HILL, DUBEY, 2002).

Durante a infecção por *T. gondii*, a interação entre os antígenos de *T. gondii* com receptores de reconhecimento padrão tais como TLRs disparam a via de sinalização intracelular mediada pela molécula adaptadora denominada proteína 88 da resposta primária de diferenciação mielóide (MyD88) (ALIBERTI, 2005, DENKERS, 2010; HOU et al., 2011).

Scanga e colaboradores (2002) foram os primeiros a demonstrar que esta molécula adaptadora é importante para iniciar uma resposta imunológica contra *T. gondii*. A sinalização desencadeada pela ativação de MyD88 é também requerida para a produção de citocinas (IL-12, IFN- γ , IL-2 e IL-10) e óxido nítrico (NO) por

células da imunidade inata e adaptativa (DENKERS, 2010, TORRES et al, 2013, RAETZ et al., 2013). Embora a sinalização mediada por TLR e MyD88 seja importante para uma resposta imunológica efetiva, esta não é a única via de reconhecimento do parasito. Durante a infecção *in vitro* uma resposta imunológica com produção de citocina IL-12 é desencadeada independente de MyD88 (KIM et al, 2006). O controle da produção de IL-12, nestes casos, pode estar relacionado à roptria (ROP16) que medeia ativação da via de transdução de sinal e ativação de transcrição (STAT)-3 (ROBBEN et al., 2004; KIM et al., 2006). Além de mediar o controle da fase aguda da infecção MyD88 parece ser importante por gerar uma resposta imunológica efetiva mediada por células T (TORRES et al, 2013).

A produção de IL-12 na fase aguda da infecção ocorre em macrófagos, neutrófilos e principalmente em células dendríticas. A secreção de IL-12 é crucial para ativação de células NK que produzem IFN γ e direcionam a proliferação de células TCD4+ e TCD8+, as quais produzem mais IFN γ (REIS E SOUSA et al., 1997).

A produção contínua de IFN γ é necessária para o controle das fases crônica e aguda da infecção por *T. gondii* (ALIBERT, 2005). Células NK e células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como macrófagos e células dendríticas são fortes produtoras de IFN γ (SUZUE et al., 2003). IFN γ participa na conversão de taquizoítas em bradizoítas (BOHNE et al., 1993) e previne a conversão de bradizoítas em taquizoítas durante a fase aguda (JONES et al., 1986). A produção de IFN γ também ativa macrófagos a produzirem TNF que atua em sinergismo com IFN γ para produção de NO. Inúmeros outros mecanismos efetores estão sob controle de IFN γ , dentre eles: geração de reativos intermediários de oxigênio (ROI), privação de ferro ou triptofano e ativação de GTPases p47 (MILLER et al., 2009).

O NO é produzido durante o metabolismo da L-arginina em citrulina pela enzima NO sintase (NOS), esta por sua vez é sintetizada por muitas células da resposta imunológica como macrófagos, linfócitos, APCs, neutrófilos e células NK (COLEMAN, 2001). NOS-1 e NOS-3 são expressos constitutivamente em baixas concentrações e participam de inúmeros processos fisiológicos. Uma terceira isoforma que ocorre quando induzida é a chamada NOS-2 ou isoenzima NOS induzida (iNOS). Esta isoforma é ativada na presença de citocinas tais como IFN γ , TNF e IL-1b em resposta a infecções parasitárias (BRUNET, 2001). NO tem ação

direta sobre *T. gondii* por inibir enzimas nucleares e de mitocôndrias que são essenciais para o parasito (BRUNET, 2001, TAKÁCS et al., 2012).

Outra via microbicida dependente de IFN γ é a indução da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO). Esta enzima degrada o triptofano, um aminoácido essencial para *T. gondii*. Ao degradar o triptofano, o crescimento de *T. gondii* é inibido em uma variedade de células tais como: fibroblastos fetais e células endoteliais (PFEFFERKORN, 1984, NAGINENI et al., 1996, DAUBENER, MACKENZIE, 1999, ENGIN et al, 2012).

Há um grande número de células envolvidas na resposta inata contra a infecção por *T. gondii*. O infiltrado inflamatório celular na infecção por *T. gondii* consiste de neutrófilos, DCs, macrófagos, células NK (IWASAKI, MEDZHITOV, 2004). Todas estas células desempenham importante papel na resistência à infecção por *T. gondii*.

Os neutrófilos são rapidamente recrutados para os sítios de infecção por *T. gondii*. Estas células estão normalmente presentes na circulação onde elas sobrevivem após serem liberadas da medula óssea. São os primeiros fagócitos recrutados para o sítio de infecção onde fagocitam e liberam componentes microbicidas de seus grânulos, tais como ROI e NO (van GISBERGEN et al., 2005). Neutrófilos apresentam ainda atividades imunoreguladoras mediadas pela liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que atraem e estimulam outras células do sistema imune. A depleção de neutrófilos no início da infecção resulta em aumento de suscetibilidade e exacerbação da doença (BLISS et al., 2001; vanGISBERGEN et al., 2005).

Células dendríticas atuam na imunidade inata e adaptativa. A maturação de células dendríticas é caracterizada pela regulação positiva de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e outras moléculas co-estimuladoras que aumentam a proliferação de células T naíve e regulam a diferenciação de células T (KOBAYASHI et al., 2003). Células dendríticas migram para locais de infecção e são importantes para polarizar a resposta imunológica para um perfil Th1 em detrimento do perfil Th2 (REIS E SOUSA et al., 1997). Além disso, células dendríticas são essenciais para produção de IL-12 em resposta ao *T. gondii* (SANECKA, FRICKEL, 2012).

Além de neutrófilos e células dendríticas, os macrófagos desempenham inúmeras funções na imunidade contra toxoplasmose. Macrófagos são os fagócitos mais importantes e desempenham funções importantes na detecção e eliminação de patógenos. Juntamente com as DC, os macrófagos formam a primeira linha de defesa mediada por células e são importantes em limitar o crescimento de patógenos (STAFFORD et al, 2002, LIU et al., 2006). As funções dos macrófagos incluem: produção de citocinas (tais como IL-12), apresentação de antígenos a células T por meio de moléculas do MHC e moléculas co-estimuladoras, importantes em desencadear a resposta imunológica adaptativa assim como mecanismos microbicidas efetores, degradação fagossomal e produção de NO e ROI (BUTCHER, DENKERS, 2002; STAFFORD et al, 2002).

Células NK são células da imunidade inata que contribuem para a resistência ao *T. gondii*. Estas células são a primeira fonte de IFN γ em resposta a este parasito e são capazes de reconhecer e matar células infectadas (FRENCH et al., 2006; GOLDSZMID et al., 2007). A citotoxicidade das células NK pode ser positivamente regulada na presença de IL-18 proveniente de macrófagos e DCs (FRENCH et al., 2006). Após infecção, células NK são recrutadas e liberam IFN γ para ativarem macrófagos e aumentam a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHCII) (KHAN, et al., 2006). Células NK têm ainda uma importante função em iniciar uma resposta adaptativa aumentando a resposta de células TCD4+ e TCD8+ (COMBE et al., 2005).

Todas as respostas celulares acima descritas são importantes para mediar o controle da proliferação de *T. gondii*. A ativação destas células do sistema imune inato é iniciada pelo reconhecimento de estruturas específicas ou antígenos de *T. gondii* pelos receptores de reconhecimento padrão. Esta interação antígeno-receptor dispara uma cascata de sinalização intracelular que por sua vez resulta na indução de resposta imunológica (KAWAI, AKIRA, 2005).

1.1.5. Sinalização intracelular envolvida na resposta imune inata

Uma vez que antígenos de *T. gondii* interagem com os respectivos receptores, MyD88 associa-se ao receptor com posterior recrutamento de membros da família quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK). A fosforilação de IRAK conduz a uma série de interações entre proteínas que dão início às vias do Fator Nuclear

kappa B (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPk) (KAWAI, AKIRA, 2005; MILLER et al, 2009; DENKERS, et al., 2010).

Estas vias de transdução de sinais são vias de sinalização evolucionariamente antigas e fazem parte de muitos processos fisiológicos, incluindo uma importante função na defesa contra a infecção. A ativação destas vias culmina na indução de inúmeros genes envolvidos nas respostas inflamatórias e são importantes na defesa contra infecção incluindo IL-12p40, TNF α , IL-6 e iNOS (AKIRA, TAKEDA, 2004; LIESENFELD et al., 1996; SAEIJ et al., 2007).

As MAPK são vias de transdução de sinal altamente conservadas e importantes em diversos aspectos da resposta imunológica (vonBERNUTH, et al., 2008). Esta família de proteínas inclui as quinases relacionadas com a ativação do sinal extracelular (ERKs), as p38 MAPK e as proteínas quinases ativadas pelo estresse (SAPK/JNK) (DENKERS et al, 2004). As MAPk podem estar presentes tanto nos compartimentos citosólicos quanto nucleares. Quando estas proteínas se tornam ativas por fosforilação elas ativam fatores de transcrição que incluem: NF-IL-6, ELK-1, fator de ativação de transcrição-2 (ATF-2), proteína de ligação ao elemento responsivo- monofosfato de adenosina cíclica (CREB) e c-Jun (KOTLYAROV et al., 1999). As MAPk são ativadas pela fosforilação de domínios tripeptídicos Thr-X-Tyr mediada pelas MKKs. O resultado final desta sinalização é a produção de citocinas inflamatórias (DENKERS et al, 2004). A produção de IL-12 em macrófagos como resposta à infecção por *T. gondii* depende da fosforilação da MAPK p38 (MASON et al., 2004). A via das MAPK é também importante na resposta de neutrófilos ao *T. gondii*. A produção de IL-12 e MCP-1 nestas células é dependente de um membro da família MAPk – a JNK2 (SUKHUMAVASI et al., 2007).

1.1.6. Modulação da resposta imunológica por *T. gondii*

Embora *T. gondii* resida dentro de um vacúolo intracelular próprio, este parasito influencia seu próprio destino por manipular diversas vias da resposta imune que a célula hospedeira usa na tentativa de eliminá-lo. *T. gondii* é capaz de interferir em diversas atividades da resposta imune inata de modo a assegurar um ambiente seguro para o seu crescimento bem como reduzir os danos teciduais. Uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro pode ser prejudicial tanto para o

parasito, quanto para o hospedeiro (REIS E SOUSA et al., 1997; HARKER et al., 2013).

T. gondii é capaz de modular a resposta imunológica por estimular citocinas pro e antiinflamatórias. A secreção de IL-10 induzida por *T. gondii* pode desativar macrófagos e, conseqüentemente, diminuir a atividade de combate à infecção pela diminuição da produção de IFN γ . Esta estratégia facilita a sobrevivência intracelular do parasito (BOGDAN, NATHAN, 1993). Outras citocinas de perfil antiinflamatório (IFN α/β) também são induzidas por *T. gondii* e a presença destas relacionam-se com produção reduzida de IFN γ (DIEZ et al., 1989).

Em macrófagos, as cascatas de sinalização de vias pró-inflamatórias (MAPk e NF-kB) são alvos constantes para a manipulação por *T. gondii*. Este parasito subverte a cascata de sinalização da via NFkB, particularmente no início da infecção (BUTCHER et al., 2001; SHAPIRA et al., 2002) resultando em um bloqueio transitório na produção de IL-12 e um bloqueio quase completo e sustentado na produção de TNF (BUTCHER, DENKERS, 2002). Há evidências de que *T. gondii* bloqueia a via NFkB de modo direto, já que estas respostas ocorrem em células infectadas apenas na presença de parasitos vivos (BUTCHER et al., 2001). Nestas células infectadas ocorre a fosforilação do inibitor Kb (IKB) por Ikb Kinase que leva a dissociação do fator transcricional NFkB e degradação no proteassoma (GHOSH, KARIN 2002).

O bloqueio da translocação nuclear de NFkB em macrófagos em fases iniciais da infecção por *T. gondii* não explica a todos os efeitos mediados por *T. gondii* em manipular a resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, a produção de IL-12 não é completamente inibida pela inativação da via NFkB. Estes achados sugerem fortemente que *T. gondii* também interfere com as vias das MAPk. A infecção de macrófagos com parasitos vivos resulta em rápida ativação de ERK1/2, SAPk/JNK e P38 MAPk seguindo por imediata desativação de cada uma destas proteínas (VALÉRE et al., 2003; KIM et al., 2004). É provável que a inativação de MAPk por *T. gondii* seja dependente de seqüestro de fosfatases do hospedeiro (DENKERS, BUTCHER, 2005). Outra via de sinalização que sofre interferência da ação de *T. gondii* é a via de Tradução de Sinal e Ativação de Transcrição 3 (STAT3). A manipulação desta via leva a uma modulação negativa na produção de IL-12 e TNF α (BUTCHER, 2005).

T. gondii também é capaz de evadir de mecanismos imunológicos efetores mediados por IFN γ . Esta citocina é considerada o principal mediador da resistência contra *T. gondii* (SUZUKI et al., 1988). Os mecanismos de inibição da atividade transcricional mediada por IFN γ deve ser crucial para a habilidade do parasito de sobreviver intracelularmente e estabelecer uma infecção persistente (LANG et al., 2007).

Assim, os mecanismos de resposta imunológica associados com os mecanismos de escape do parasito levam ao balanço necessário para a manutenção do parasito e sobrevivência do hospedeiro. A perda deste balanço pode levar a manifestações graves da doença. Tais condições são evidentes em indivíduos imunocomprometidos (indivíduos positivos para o vírus da Imunodeficiência Humana – (HIV), ou sob o uso de drogas imunossupressoras). Nestes indivíduos a ausência de uma resposta imunológica adequada pode desencadear em formas graves da toxoplasmose. Estes indivíduos podem desenvolver quadros de manifestações neurológicas, distúrbios de nervos cranianos, anormalidades sensoriais até mesmo quadros psicóticos, assim como encefalite fatal (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.1.7. Influência de hormônios na infecção parasitária

Além dos inúmeros mecanismos de modulação de resposta imunológica pelos parasitos, alguns fatores do próprio hospedeiro podem levar a subversão da resposta imunológica e desta forma influenciar na gravidade da doença.

A habilidade de hormônios sexuais e hormônios associados à gestação relacionarem-se com a severidade da toxoplasmose é um aspecto importante principalmente devido à relação com a doença congênita (BOYER, McLEOD, 1998).

Existem consideráveis evidências de que hormônios esteróides afetam o curso da toxoplasmose em camundongos e humanos. Foi demonstrado que fêmeas desenvolvem inflamação cerebral mais grave que machos e que administração de estrógeno exacerba a doença em camundongos. Estes dados suportam a hipótese da influência de esteróides na gravidade da infecção por *T. gondii* (HENRY, BEVERLEY, 1976; KITTAS, HENRY, 1980). Estas diferenças na susceptibilidade correlacionam-se às diferenças funcionais na resposta imunológica dependente de hormônios. Estrógeno afeta a produção de IFN- γ (FOX, BOND, PARSLOW, 1991);

além disso, estrógeno e progesterona exercem efeitos inibidores nas funções de macrófagos, mais notavelmente na produção de óxido nítrico (BROWN et al, 1995). A progesterona inibe o desenvolvimento de resposta imunológica de perfil Th1 em favor do perfil Th2 devido à modulação de atividades de proteínas MAPK por estes hormônios (MIYAURA, IWATA, 2002). Além disso, é provável que a progesterona regule a atividade de células TCD4⁺ ao reprimir o gene que codifica a produção de IFN γ . Estes dados demonstram a íntima inter-relação entre os sistemas endócrino e o imunológico (HUGHES et al., 2013).

Os níveis hormonais, mais notavelmente estrógeno e progesterona, são amplamente aumentados durante a gestação e conseqüentemente, modulam o sistema imunológico e, desta forma, geram importantes conseqüências na transmissão vertical de protozoários parasitos tais como *T. gondii* (ROBERTS et al., 2001).

1.2. A Toxoplasmose congênita

A gestação tem importante influência no resultado da infecção por *T. gondii*. Durante o período gestacional, as respostas do hospedeiro são alteradas devido às modificações imunológicas que ocorrem no sentido de favorecer a tolerância materna aos aloantígenos paternos a fim de garantir a implantação e desenvolvimento do feto (ROBERTS et al., 1996). Durante a gestação a concentração de hormônios circulantes, incluindo estrógeno, testosterona, e principalmente, a progesterona é bastante aumentada (ROBERTS et al, 2001). A progesterona inibe a produção de IL-12, TNF e NO por macrófagos (MILLER, HUNT, 1998), e aumenta a produção de IL-10 por células dendríticas (CD) (HUCK et al, 2005) com conseqüente redução da atividade de células NK (ROBERTS et al, 2001). Assim, parece claro que a gestação é um estado de imunoprivilégio uma vez que a resposta imunológica do tipo Th2 é favorecida em detrimento da resposta imunológica do tipo Th1 (MIYAURA, IWATA, 2002), biologicamente incompatível com o sucesso da gestação (RAGHUPATHY, 2001).

Quando a gestação é associada com a infecção por patógenos tais como *T. gondii* se estabelece um paradoxo imunológico. Por um lado existe a necessidade de uma resposta inflamatória para combater a infecção e ao mesmo tempo necessidade de um estado de imunoprivilégio para garantir o sucesso da gestação.

Um aspecto particularmente intrigante da toxoplasmose congênita refere-se à diferença de suscetibilidade de transmissão vertical de *T. gondii* no curso da gestação. A possibilidade de transmissão vertical é mais freqüente nos dois últimos trimestres gestacionais (LYNFIELD, GUERINA, 1997). Caso ocorra a infecção materna no primeiro trimestre gestacional, quando os níveis de hormônio estão baixos, ocorre polarização para um perfil de resposta do tipo Th1 resultando em menores índices de transmissão vertical, mas com maiores chances de aborto. De modo oposto, se a infecção ocorre no terceiro trimestre gestacional, quando há forte polarização Th2, é improvável a ocorrência de aborto, mas é alta a chance de transmissão congênita (ROBERTS, et al. 2001).

Diferentes hipóteses visam esclarecer as diferenças de susceptibilidade associadas à idade gestacional. Acredita-se que a barreira placentária tenha papel preponderante no grau de susceptibilidade à infecção por *T. gondii* (van GISBERGEN et al., 2005). Em fases iniciais da gestação, onde a barreira placentária encontra-se mais espessa, têm-se um menor índice de transmissão vertical e estes índices aumentam com o aumento da idade gestacional à medida que a barreira torna-se mais delgada (PFFAF et al., 2007). Entretanto, novas abordagens abrangendo a imunologia da gestação precisam ser realizadas na tentativa de melhor esclarecimento das interações que ocorrem na interface materno-fetal em diferentes idades gestacionais.

1.3. Fator de Inibição de Macrófagos (MIF) na gestação e na infecção parasitária

Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) é uma citocina que foi descrita por David (1966); Blomm e Bennett (1966), que a identificaram como um fator produzido por linfócitos associado com a inibição de migração randômica de macrófagos durante resposta de hipersensibilidade tardia. Entretanto, a importância desta citocina foi negligenciada por muito tempo, por falta de compreensão das atividades biológicas de MIF. Estas funções começaram a ser esclarecidas a partir de 1989 com a clonagem do cDNA de MIF humano (WEISER, et al., 1989). Atualmente inúmeras atividades fisiológicas já estão descritas para esta citocina.

Existem fortes evidências do envolvimento de MIF em processos reprodutivos em geral, e, principalmente processos envolvidos com reações inflamatórias tais

como: ovulação (WADA et al., 1997), ciclo menstrual (ARCURI et al., 2001) e fase inicial da gestação (ARCURI et al., 1999). MIF também foi detectado em ovário, oviduto e no útero, principalmente no endométrio sugerindo que MIF é parte do repertório molecular que contribui para a função endometrial local (SUZUKI et al., 1996; KLEIN, TROEDSSON, 2013).

Além disso, foi demonstrado que MIF é expresso em altas quantidades em tecidos humanos em estágios de pré-implantação e durante a implantação embrionária (ARCURI et al., 1999, ARCURI et al., 2001). MIF também já foi detectado em membranas fetais, fluido amniótico e placenta (ARCURI et al., 2007). Na placenta, MIF é principalmente identificado em citotrofoblasto de vilos flutuantes, em vilos de ancoragem e também em trofoblasto extraviloso (ARCURI et al., 1999). Estes dados sugerem que MIF é um componente integral da complexa rede de citocinas em tecidos placentários (ARCURI et al., 1999).

O aumento na produção de quimiocinas na placenta durante uma reação inflamatória contribui para que haja um acúmulo de macrófagos e monócitos no espaço interviloso (SUGUITAN et al., 2003, PFAFF et al., 2005). Provavelmente, o aumento nos níveis de MIF em sangue interviloso possa exercer importante papel na ativação de macrófagos, suprimindo ou minimizando o efeito imunossupressivo dos hormônios corticóides na placenta (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002).

MIF atua como citocina, sendo conhecida como regulador chave da imunidade inata e adquirida, importante na indução da resposta inflamatória a vírus e bactérias (CALANDRA, et al., 1995; BERNHAGEN et al., 1993). MIF é capaz de sobrepor o efeito imunossupressivo de hormônios glicocorticóides na expressão de outras citocinas pro-inflamatórias (CALANDRA et al., 1995). Além disso, é um fator conhecido por modular apoptose mediada por proteína supressora de tumor, p53. MIF tem uma importante correlação com resposta inflamatória de longa duração e, conseqüentemente, com formação de tumores (HUDSON et al., 1999).

A citocina MIF é liberada por macrófagos ativados por vários estímulos pró-inflamatórios tais como lipopolissacarídeos, síndrome de choque toxêmico por toxina 1, TNF- α e IFN- γ (BERNHAGEN et al., 1998; MARTINEY et al., 2000). MIF tem ainda a propriedade de ativar macrófagos e é capaz de promover a morte de parasitos intracelulares (BERNHAGEN et al., 1998). Isto se deve à capacidade de inibir a migração randômica de macrófagos sugerindo que estes se acumulem no

local de atuação (BERNHAGEN et al., 1998), além de regular a atividade de células *Natural Killer* (NK) (APTE et al., 1998). Assim, nível elevado de MIF pode ser patogênico por promover uma resposta inflamatória excessiva. Entretanto, em concentrações adequadas parece promover uma resposta inflamatória potente capaz de promover proteção contra doença grave para assegurar uma rápida e eficiente eliminação de parasitos, tais como *Plasmodium falciparum* (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002).

MIF demonstra importante atividade pró-inflamatória e atua na defesa contra inúmeros patógenos; exerce função fundamental na imunidade contra *Salmonella typhimurium* e outras bactérias, sendo um importante mediador da resposta do organismo hospedeiro, promovendo desenvolvimento de uma resposta de perfil Th1 e alterando os níveis de reativos intermediários de nitrogênio (KOEERNICK et al., 2002).

MIF exerce funções inflamatórias similares em organismos protozoários tais como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *T. gondii*. A infecção com estes parasitos em camundongos MIF^{-/-} leva a altos graus de parasitemia e imunopatologia destes animais, mais uma vez demonstrando a importância de MIF no controle de infecções (REYES et al., 2006; JÜTTNER et al., 1998; FLORES et al., 2008). Além disso, o tratamento de monócitos da linhagem THP-1 com citocina MIF recombinante resulta no controle da proliferação de *T. gondii* neste tipo celular (CASTRO et al., 2013).

1.4. MIF e Toxoplasmose

Foi demonstrado que explantes placentários regulam positivamente a produção de MIF em resposta à estimulação com antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* - STAg (FERRO et al., 2008) sugerindo potencial atividade de MIF na resposta imunológica do trofoblasto ao *T. gondii*.

Além disso, foi demonstrado que MIF é fundamental na resistência contra *T. gondii* uma vez que camundongos MIF nocaute (ko) apresentam maior suscetibilidade à infecção por estes parasitos (FLORES et al., 2008). Neste estudo foi demonstrado que camundongos MIFko apresentaram maiores comprometimentos do fígado, apresentaram mais cistos cerebrais e menor produção de citocinas pró-inflamatórias que camundongos tipo selvagem (WT). Estes

resultados demonstraram que MIF tem participação na resposta contra infecção por *T. gondii* uma vez que é capaz de mediar resistência contra este parasito.

1.5. Modos de ação de MIF

Leng e colaboradores (2003) identificaram CD74 – cadeia invariante associada ao MHCII - como receptor para MIF. Estes autores demonstraram uma alta afinidade entre MIF e CD74 e comprovaram a necessidade da expressão de CD74 para promover uma resposta celular mediada por MIF. As respostas celulares subsequentes a esta ligação são: sinalização regulada por ERK1/2 e outras MAPK. Posteriormente, ocorre transdução de sinal, transcrição gênica, expressão de moléculas efetoras e replicação celular (MITCHELL, et al., 1999, LUE, et al, 2011) (Figura 1).

MIF induz ativação de ERK1/2 dependente de proteína quinase A e está associada com o aumento da atividade enzimática da fosfolipase citoplasmática A2 (cPLA2). cPLA2 é um importante componente intracelular responsável por ativar a cascata pró-inflamatória, resultando na produção de ácido araquidônico e posteriormente em prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrienos. cPLA2 é também o alvo de efeitos antiinflamatórios por glicocorticoides, na presença destes hormônios ocorre transcrição e ativação de anexina I, uma proteína antiinflamatória que interage e inibe a cPLA2. Portanto, a indução de PLA2 via ERK1/2 é um dos mecanismos de ação de MIF para sobrepor o efeito imunossupressivo de glicocorticoides (MITCHELL, et al., 1999), (Figura 1).

Outro mecanismo pelo qual MIF pode atuar é por meio da ativação da via NF- κ B, um fator transcricional envolvido na regulação da expressão de muitos genes pro-inflamatórios incluindo citocinas, moléculas de adesão e ciclooxigenase (COX) (MITCHELL, et al., 1999). Muitos estudos mostram que a ativação de NF- κ B por MIF é um dos mecanismos para suprimir a atividade antiinflamatória de glicocorticóides (DUAN, CANNON, 2000), (Figura 1).

Não há dados na literatura que mostrem o mecanismo de ação de MIF em tecidos placentários. O melhor entendimento do modo de ação de MIF em tecidos placentários submetidos à infecção por *T. gondii* poderá fornecer importantes esclarecimentos sobre o papel desta citocina na interface materno-fetal, além de

apresentar-se como importante ferramenta capaz de elucidar as diferenças de susceptibilidade à infecção que ocorrem em diferentes idades gestacionais.

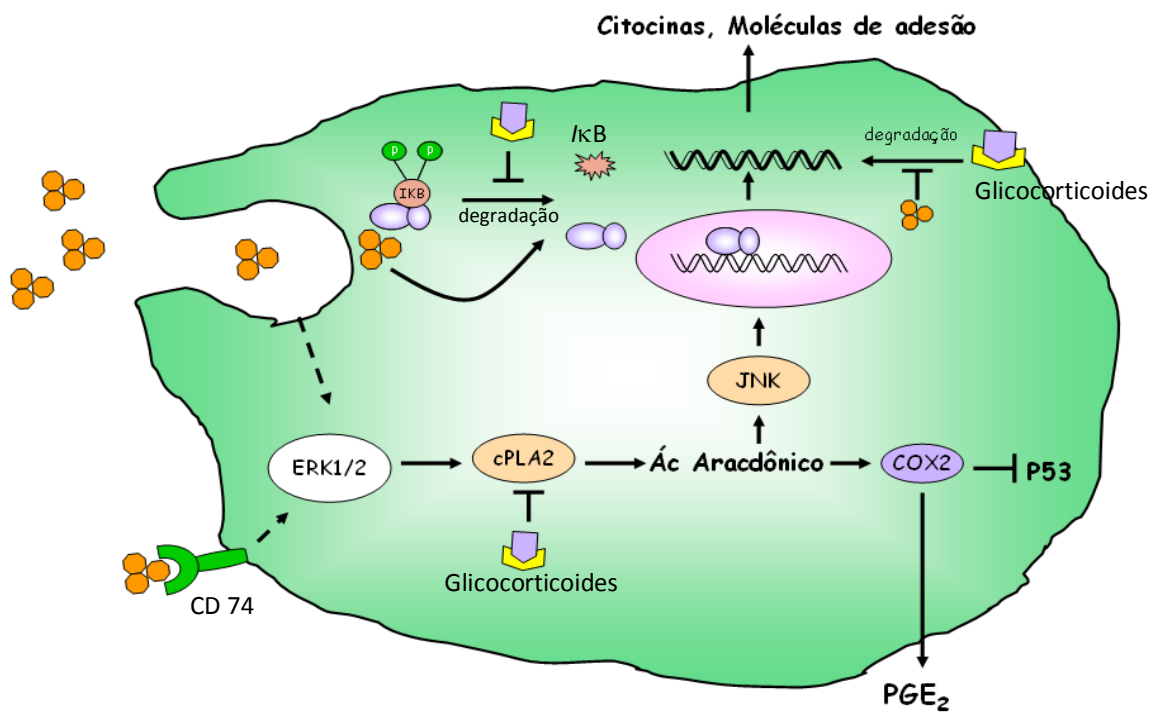


Figura 01: esquema representativo das vias de sinalização desencadeadas por MIF após estímulo antigênico. MIF liga-se ao receptor CD74 ou entra na célula por endocitose. Posteriormente, ocorre fosforilação de ERK1/2, que conduz ao aumento da atividade enzimática de cPLA2 e metabolismo do ácido aracídico. O resultado final desta ativação é a produção de fatores pró-inflamatórios tais como cicloxigenase (COX2) e prostaglandinas (PGE2). Além disso, ocorre ativação de NFκB que leva a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN γ , TNF α , IL-18, IL1 β e IL-17) e moléculas de adesão. Cada uma destas vias pode ser inibida pela presença de hormônios glicocorticóides. Modificado de Calandra, Roger (2003).

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença que normalmente cursa de forma assintomática em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, durante a gestação, a resposta imunológica materna fica comprometida devido à geração de um microambiente de privilégio imunológico capaz de permitir o desenvolvimento de um enxerto alográfico dentro do corpo materno.

O presente trabalho se justifica pela necessidade de um modelo experimental capaz de avaliar as diferenças de susceptibilidade à infecção por *T. gondii* em diferentes idades gestacionais além de avaliar os possíveis mecanismos que favorecem estas diferenças. Assim, focamos nossas investigações no papel de MIF como um possível fator capaz de controlar a infecção tendo como premissa que esta citocina é naturalmente expressa durante o curso da gestação e que pode ser induzida em vez de inibida na presença de fatores antiinflamatórios comumente encontrados no microambiente placentário. MIF desempenha inúmeras funções imunológicas tais como fagocitose, inflamação e inibição da apoptose de neutrófilos. Além disso, MIF tem-se mostrado importante para o controle da infecção de diversos patógenos, tais como bactérias, protozoários e helmintos. A secreção de MIF é regulada durante o curso da gestação e esta regulação parece estar associada com os inúmeros papéis fisiológicos de MIF na gestação. Desta forma, a investigação de MIF como um possível fator capaz de desencadear uma resposta imunológica potente contra infecção congênita por *T. gondii* parece ser uma ferramenta promissora capaz de adicionar dados que favoreçam a compreensão de um universo de interações que ocorrem na interface materno-fetal.

3. OBJETIVOS:

3.1.Objetivo geral

Avaliar a participação funcional de MIF nas diferenças de susceptibilidade de tecidos placentários à infecção por *T. gondii*, bem como as possíveis vias de sinalização envolvidas na regulação de MIF em trofoblasto de primeiro e terceiro trimestre de gestação infectados por *T. gondii* e avaliar os possíveis fatores que estão envolvidos nesta regulação.

3.2.Objetivos específicos:

3.2.1. Experimentos *in vitro*

- Quantificar a mensagem para o receptor de MIF (CD74) e comparar a expressão do receptor em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação;
- Avaliar a liberação e expressão de MIF em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação quando infectados por *T. gondii* em comparação com os controles não infectados;
- Verificar quais as possíveis citocinas requeridas para a liberação de MIF em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação infectados ou não;
- Avaliar o parasitismo tecidual em explantes de placentas de primeiro e terceiro trimestre na presença e ausência de MIF exógeno em comparação com outras citocinas anti e pro-inflamatórias (IL-10, TGF- β -1, IL-12, IFN γ);
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação de MIF em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação;
- Verificar se proteínas da família das MAPk participam no controle da infecção por *T. gondii*, dependente de MIF, em explantes primeiro e terceiro trimestre de gestação
- Quantificar a liberação de citocinas em explantes de placentas de primeiro e terceiro trimestre de gestação estimulados com inibidores das proteínas MAPk e infectados ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a expressão e localização de proteínas da família MAPk em trofoblasto de primeiro e terceiro trimestre de gestação na presença ou ausência de MIF e na presença e ausência de infecção;

- Avaliar a expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação;

3.2.2. Experimentos *in vivo*

- Avaliar comparativamente animais C57Bl/6 MIF^{-/-} e C57Bl/6 selvagem quanto à morbidade frente à infecção por *T. gondii*;
- Avaliar comparativamente animais C57Bl/6 MIF^{-/-} e C57Bl/6 selvagem quanto à expressão de IDO no útero de fêmeas não-prenhes infectadas ou não com *T. gondii* em comparação com útero de fêmeas prenhes infectadas ou não com *T. gondii*;
- Avaliar comparativamente animais C57Bl/6 MIF^{-/-} e C57Bl/6 selvagem quanto à expressão de COX-2 no útero de fêmeas não-prenhes infectadas ou não com *T. gondii* em comparação com útero de fêmeas prenhes infectadas ou não com *T. gondii*;
- Avaliar comparativamente animais C57Bl/6 MIF^{-/-} e C57Bl/6 selvagem quanto à produção de citocinas (perfil Th1/Th2) no soro de fêmeas não prenhes infectadas ou não com *T. gondii* em comparação com o soro de fêmeas prenhes infectadas ou não com *T. gondii*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.1.1. Submissão e aprovação do Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia e está aprovado sob protocolo 006/09 (Anexo I).

4.1.2. Cultivo de explantes de vilos coriônicos de placenta humana

Placentas humanas de terceiro trimestre de gestação (36 – 40 semanas) foram coletadas de cesarianas. Além disso, placentas de primeiro trimestre de gestação (9 – 12 semanas) foram obtidas de gestações interrompidas. Todas as placentas foram coletadas após a autorização materna e foram obtidas de mulheres sorologicamente negativas para toxoplasmose ou qualquer outra infecção. Além disso, foram excluídas de nosso grupo experimental mulheres com pré-eclâmpsia, hipertensão e diabetes.

As placentas coletadas foram lavadas em PBS estéril gelado (pH 7.2) e dissecadas com auxílio de estereomicroscópio para remoção de tecido endometrial e membranas fetais no tempo máximo de uma hora após a coleta. Vilos coriônicos placentários contendo 15-20 terminações livres foram coletados conforme previamente descrito (CANIGGIA et al., 1997). O volume dos explantes foi determinado conforme previamente descrito (FERRO et al., 2008). Brevemente, 800µl de meio RPMI foi adicionado a uma pipeta e o vilo coriônico foi adicionado a este meio ficando totalmente submerso no meio. A quantidade de volume acrescido foi considerada o volume do vilo. De modo geral o volume dos vilos era de aproximadamente 10mm³.

Os explantes foram adicionados à placas de 96 cavidades (um explante por poço) e cultivados em 200µl de meio RPMI suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e antibióticos (meio completo) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.3. Parasitos

Taquizoítas da cepa RH 2F1 de *T. gondii*, expressando a enzima beta galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo professor Vernon B. Carruthers da Universidade de Michigan, USA. Os parasitos foram então mantidos em cultura de células trofoblásticas de linhagem BeWo (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Os parasitos foram mantidos por passagens nesta linhagem celular até o momento de infecção dos explantes placentários.

4.1.4. Tratamento e infecção dos explantes de vilos placentários humanos

Explantes de vilos coriônicos foram tratados usando várias concentrações de MIF (5, 25 e 100 ng/mL); IL-12 (25 ng/mL); IFN- γ (25 ng/mL); TGF β 1 (1 e 10 ng/mL) ou IL-10 (10 e 25 ng/mL). Explantes não tratados foram utilizados como controle. Condições experimentais e controles foram conduzidos em paralelo.

Após 24 horas de incubação com os respectivos tratamentos os explantes foram infectados ou não com taquizoítas da cepa RH 2F1 de *T. gondii* (1×10^6 parasitos/poço) e foram incubados por mais 24 horas. Os explantes foram a seguir lavados com meio RPMI e novamente incubados com os mesmo estímulos por mais 24 horas. Os explantes de vilos placentários foram coletados para análise morfológica, imuno-histoquímica e PCR. O sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado a -80°C para mensuração de MIF e NO.

Além disso, os vilos placentários foram cultivados e tratados ou não com MIF (100ng/mL) e infectados ou não com taquizoítas da cepa RH 2F1 de *T.gondii*. Após 24 horas de infecção, os explantes foram novamente tratados ou não com MIF e coletados de acordo com a seguinte cinética (10', 30', 1h, 24hs). A seguir, os vilos coletados foram armazenados a -80°C para análise por *western blotting*. Além disso, os vilos foram coletados e fixados para posterior ensaio de imuno-histoquímica para localização de proteínas da família das MAPK.

Finalmente, vilos placentários foram tratados ou não com MIF (100ng/mL) e com inibidores das MAPK. SP600125: inibidor da JNK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO); SB203580: inibidor da p38 (Sigma-Aldrich Corp.); PD98059: inibidor

da ERK1/2 (Sigma-Aldrich Corp.) e apiginina (Sigma-Aldrich Corp.). Todos os inibidores foram adicionados na concentração de (10 μ M). A seguir os vilos foram infectados ou não com a cepa RH 2F1 de *T. gondii* e após 24 horas o tratamento foi repetido conforme descrito acima. Após 24 horas de tratamento os vilos foram coletados e congelados para posterior análise de parasitismo pela reação da beta galactosidase. O sobrenadante de cultura foi armazenado para posterior análise de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias por ELISA.

4.1.5. Determinação da concentração protéica dos vilos coriônicos

Explantes coriônicos foram homogeneizados em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) [50 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1%) e SDS (0.1%); pH 7.5] adicionado de coquetéis de inibidores de protease (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemanha). O homogenato foi centrifugado a 15000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado para mensuração de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração total de proteínas (mg/mL) foi usada para normalizar os dados do parasitismo pela reação da beta-galactosidase para determinar a concentração de proteínas nas reações de western blotting e para normalizar os dados de dosagem de citocinas obtidos pelo método de ELISA. Os dados da reação de ELISA foram então expressos em (pg/mg).

4.1.6. Mensuração NO

Sobrenadante de vilos placentários tratados com MIF e citocinas pró e antiinflamatórias foram utilizados para quantificação de NO pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Brevemente, amostras foram adicionadas a placas de 96 cavidades e misturadas na proporção de 1:1 com sulfanilamida (1%) e dicloridrato de n(1-naftil)-etilenodiamina - NEED (0.1%) em ácido fosfórico (H₃PO₄ -2.5%). A absorbância foi detectada em leitora de microplaca a 570nm e a concentração de NO foi determinada com base em uma curva de referência padrão de nitrito de sódio com concentração de 5 a 200 mol/L.

4.1.7. Dosagem de citocinas

Sobrenadante de cultura de explantes tratados ou não com citocinas pró e antiinflamatórias e infectados ou não com taquizoítas de *T. gondii* foram utilizados para dosagem de MIF (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Oxford, England). Sobrenadante de cultura de tecidos tratados ou não com inibidores das MAPK e infectados ou não com taquizoítas de *T. gondii* foram utilizados para dosagem de IL-10 (R&D Systems), IL-13 (R&D Systems) e TGFβ1 (R&D Systems). Todas as reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante para ELISA sanduíche. Brevemente, placas foram incubadas com anticorpo de captura. A seguir as placas foram bloqueadas e incubadas com as amostras ou com as respectivas citocinas recombinantes para a construção da curva padrão. Após serem lavadas as placas foram incubadas com anticorpo de detecção biotinilado específico para cada citocina. Os ensaios foram desenvolvidos usando estreptavidina acoplada peroxidase (HRP) e revelados com 3'3'-5'5' tetrametilbenzidina (TMB). As concentrações de cada citocina foram determinadas pela extrapolação da curva padrão com concentrações conhecidas de cada uma das citocinas. A sensibilidade do ensaio para IL-10, IL-13, TGFβ1 e MIF foram de 36, 46, 18 e 18 pg/mL respectivamente.

4.1.8. Imuno-histoquímica

Ensaio de imuno-histoquímica foram realizados para imunolocalização do receptor de MIF (CD74), imunolocalização de MIF, de *T. gondii*, de proteínas da família das MAPK (JNK, ERK1/2, P38) e da IDO.

Para isso, explantes de placenta cultivados foram fixados e embebidos em parafina. A seguir realizou-se microtomia com obtenção de cortes com 4μm de espessura. Para resgate antigênico os cortes foram cobertos com solução de tripsina (0.05% de tripsina e 0.1% de cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) durante 30 minutos à 37°C. Os cortes foram então incubados com solução de ácido acético 5% em TBS a temperatura ambiente para bloqueio da fosfatase endógena.

Para detecção de MIF e pJNK os explantes foram tratados com soro normal de coelho 2.5% em TBS para bloqueio de sítios inespecíficos. Os cortes

histológicos foram incubados com anticorpo policlonal anti-MIF humano MIF produzido em cabra (R&D Systems Europe Ltd.) e anticorpo policlonal anti-pJNK produzida em cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), respectivamente. As lâminas foram incubadas *overnight*, a 4°C. O controle da reação foi realizado pela substituição do anticorpo primário pelo soro normal de cabra. As lâminas foram lavadas com TBS e incubados com anticorpo de coelho anti IgG de cabra conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch, Europe, Ltda, Newmarket, Suffolk, Inglaterra) durante 1 hora, a 37°C.

Alternativamente, para detecção de CD74, *T. gondii* e IDO os cortes foram tratados com soro normal de cabra 2.5% em TBS para bloqueio de sítios inespecíficos. A seguir, foram incubados com anticorpo de camundongo anti-CD74 (eBioscience, Inc., San Diego, CA) ou com soro de camundongo anti-*T. gondii* ou com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IDO (Santa Cruz Biotechnology) respectivamente. As lâminas foram incubadas *overnight*, a 4°C. O controle da reação foi realizado pela substituição do anticorpo primário pelo soro normal de camundongo. As amostras foram lavadas com TBS e incubadas com anticorpo de cabra anti IgG de camundongo conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora, a 37°C.

Finalmente, para detecção de p-p38 e pERK1/2 as lâminas foram incubadas com soro normal de cabra 2.5% em TBS para bloqueio de sítios inespecíficos. A seguir, foram incubadas com anticorpo de coelho anti-pp38 (Santa Cruz Biotechnology) ou com anticorpo de coelho anti-pERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology) respectivamente. Os cortes foram incubados *overnight*, a 4°C. O controle da reação foi realizado pela substituição do anticorpo primário pelo soro normal de cabra. As lâminas foram lavadas com TBS e incubadas com anticorpo de cabra anti IgG de coelho conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora, a 37°C.

Todas as amplificações foram feitas usando-se o complexo ABC (complexo streptavidina, biotina, fosfatase alcalina [ABC kit; Vector Laboratories, Inc., Burlington, CA]) e desenvolvidas com Fast-Red-Naftol (Sigma-Aldrich Corp.) e contracoradas com hematoxilina de Mayer.

4.1.9. Quantificação do parasitismo por PCR em tempo real

Para avaliação do parasitismo por PCR, explantes de placenta de primeiro e terceiro trimestre de gestação tratados ou não com citocinas pró ou antiinflamatórias e infectados com taquizoítas de *T. gondii* foram coletados para quantificação do parasito por PCR em tempo real usando método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (BIECHE et al., 2001). A extração do DNA foi realizada com uso de tampão de lise (10mmol/L de Tris, 5mmol/L de EDTA, 0.2% de SDS e 200mmol/L de NaCl) adicionado de proteinase K (20mg/mL). O DNA foi precipitado com isopropanol. As amplificações da reação de PCR e análise foram realizadas usando um detector de sequências (ABI Prism 7500; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Todas as reações foram realizadas usando o Master Mix PCR SYBR Green (Applied Biosystems, Inc.) com um volume de 10µL em cada reação (25ng do *template* de cDNA, 2.5pmol de cada primer e 5µL de SYBR Green). Os ciclos foram processados de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra foi testada em duplicata e todas as quantificações foram normalizadas com base na β -actina humana. Os primers usados para amplificações da reação de PCR correspondem ao gene B1 de *T. gondii* (amplicon 50pb), forward, 5'-TTCAAGCAGCGTATTGTCGA-3' e reverse 5'-CATGAACGGATGCAGTTCCT-3' e o gene para β -actina humana (amplicon 100pb), forward, 5'-AAGGATTCCTATGTGGGCGA-3' e reverse 5'-TCCATGTCGTCCCAGTTGGT-3'. Taquizoítas de *T.gondii* da cepa RH (10^7 parasitos) foram usados como controle positivo da reação e amostras de explantes de placentas não-infectadas foram usadas como controle negativo da reação. Os dados foram analisados usando o software Data Analysis and Technical Graphics software (Versão original 6.0; Microcal Software, Inc., Northampton).

4.1.10. Quantificação do parasitismo por imuno-histoquímica

Para quantificação e imunolocalização dos parasitos, explantes de placenta de primeiro e terceiro trimestre de gestação infectados e não tratados foram analisados. Para quantificação da carga parasitária nos explantes de placenta a quantificação foi realizada em cinco seções não contínuas separados

por 40µm de distância. O número de parasitos no explante inteiro foi quantificado. Para cada campo microscópico a imunolocalização foi determinada como a seguir: parasitos aderidos ao trofoblasto, parasitos dentro do trofoblasto e parasitos dentro do mesênquima. A soma dos parasitos nestes três campos foi considerada a carga parasitária total por tecido. Uma vez que os vilos tinham tamanhos similares, foi possível quantificar aproximadamente 10 campos microscópicos por vilo (aumento original 40x). Variações nestes valores foram ajustadas para obtenção de 10 campos microscópicos por vilo. Todos os vilos eram compostos de áreas de tecido conjuntivo envolvidos por trofoblasto.

4.1.11. Quantificação do parasitismo por reação enzimática

Para quantificação da proliferação intracelular de *T. gondii* foi utilizado um ensaio colorimétrico conforme descrito por Teo e colaboradores (2007) com modificações. Brevemente, os vilos placentários previamente congelados foram incubados com tampão lise acrescidos de inibidor de protease. Após quantificação protéica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), 100ng de proteínas foram adicionadas a microplacas de 96 cavidades para desenvolvimento do ensaio enzimático. Paralelamente, foi adicionada uma curva padrão contendo taquizoítas da cepa 2F1 RH de *T. gondii*. Os parasitos foram lisados com tampão RIPA e incubados por 8 minutos à temperatura ambiente. A seguir adicionou-se tampão de ensaio [PBS (100mM, pH 7.3), β-mercaptoetanol (102mM), MgCl₂ (9mM)] às microplacas de 96 cavidades. Seguiu-se a adição de Clorofenol Vermelho β-D-galactopiranosídeo 3mM (CPRG) em água destilada. As placas foram incubadas por mais 30 minutos a TA em câmara escura e a leitura da reação enzimática foi feita em leitor de microplacas à 590nm.

4.1.12. Quantificação de CD74 por PCR em tempo real

Para quantificação do receptor de MIF, explantes de placentas de primeiro e terceiro trimestre de gestação foram cultivados infectados com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. A seguir foram coletados e utilizados para reação de PCR em tempo real. O RNA total foi isolado dos tecidos placentários usando reagente

Trizol (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 20µL usando Transcriptase Reversa ImProm-II (Promega Corp., Madison, WI). A mistura da reação continha, 4mg de RNA total, 20pmol de primer oligo dT (Life Technologies Corp.), 40U de inibidor de ribonuclease (RNasin; Promega Corp.), 500mmol/L de dNTP mix e 1U de transcriptase reversa em tampão de transcriptase reversa 1X. O cDNA foi tratado com 10mg de RNase (Gibco-BRL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) e foi usado imediatamente. As amplificações da reação de PCR e análise foram realizadas usando um detector de sequências (ABI Prism 7500; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Todas as reações foram realizadas usando o Master Mix PCR SYBR Green (Applied Biosystems, Inc.) com um volume de 25µL em cada reação (2µL do template de cDNA, 5pmol de cada primer e 12.5µL de SYBR Green). Os primers usados para amplificações da reação de PCR foram: β -actina (*forward*, 5'- AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3' e *reverse* 5'- AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3') e CD74 (*forward*, 5'- CATGGATGACCAACGCGAC-3' e *reverse* 5'-TGTACAGAGCTCCACGGCTG-3'). A expressão relativa de cada gene foi obtida usando o método comparativo CT e foram normalizados usando a β -actina como controle endógeno.

4.1.13. Western blotting

Explantos de placentas de primeiro e terceiro trimestre de gestação foram infectados ou não com *T. gondii* e tratados ou não MIF seguindo a seguinte cinética de coleta de material após tratamento: 10', 30', 1h e 24hs. Os explantes provenientes deste experimento foram macerados em tampão RIPA adicionados de coquetéis de inibidor de protease (Roche Diagnostic).

Após dosagem protéica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) adicionou-se 60µg de proteína total aos géis de eletroforese em concentrações apropriadas de acrilamida (SDS-PAGE). A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e estas então foram incubadas com solução de bloqueio (TBS – 3% de leite desnatado desidratado) e tratadas com anticorpos anti-proteínas da família das MAPk [anticorpo de coelho anti *p*ERK1/2 (R&D Systems); anticorpo de cabra anti-*p*JNK (Santa Cruz Biotechnology) ou

anticorpo de coelho anti-pp38 (Santa Cruz Biotechnology)]. Todas as reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram detectadas com os seguintes anticorpos secundários: anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase ou anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase. Após incubação, as proteínas fosforiladas foram visualizadas pela reação de quimioluminescência.

4.1.14. Análise estatística

Os dados foram expressos como média de três experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças entre as médias de dados paramétricos foram analisados usando análise de variância e pós-teste de Bonferroni. Alternativamente, o teste *t* de Student foi usado para comparar o índice de parasitismo entre explantes de 1º e 3º trimestre. Todos os dados foram analisados usando software disponível comercialmente (Prisma, versão 4.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

4.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.2.1. Submissão e aprovação do Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia e está aprovado sob protocolo 002/09 (Anexo II).

4.2.2. Obtenção dos animais

No presente trabalho foram utilizados animais da linhagem C57BL/6 do tipo selvagem e animais linhagem C57BL/6 do tipo nocaute para MIF (MIF^{-/-}). Os animais C57BL/6 MIF^{-/-} foram gentilmente cedidos pelo professor Dr Marcelo Torres Bozza da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os animais foram transferidos para o Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA-UFU). Neste centro os animais foram mantidos livres de patógenos específicos em ciclos diários de 12 horas de luz/escuro e livre acesso a água e ração granulada.

4.2.3. Infecção experimental

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi mantida em roedores da família Cricetidae: *Calomys callosus*. Estes animais eram previamente inoculados via oral com cistos de *T. gondii* e após pelo menos um mês de inóculo o cérebro destes doadores de cistos eram removidos e lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS). O cérebro era então homogeneizado com seringas com calibres decrescentes. A seguir os cistos foram quantificados com auxílio de um microscópio de luz e a solução de cistos foi então diluída em PBS para obtenção do número desejado de cistos (05 ou 10 cistos para cada 100µl de PBS).

4.3.4. Análise de Morbidade

Para avaliar o papel de MIF na infecção por *T. gondii* camundongos C57BL/6 MIF^{-/-} e C57BL/6 selvagem foram infectados via oral com cinco ou dez cistos de *T. gondii* da cepa Me-49, sendo que cada grupo foi composto de 05 animais. Os animais foram analisados diariamente quanto à alterações de peso

durante 21 dias consecutivos. Estes dados foram registrados para posterior análise.

4.2.5. Acasalamento e detecção de prenhez

Para avaliar o papel de MIF na infecção por *T. gondii* em animais prenhes, fêmeas virgens de C57BL/6 MIF^{-/-} e C57BL/6 selvagem foram colocados para acasalar com os respectivos machos. As fêmeas foram avaliadas todos os dias pela manhã para detecção de rolha vaginal (mistura de sêmen com secreção vaginal). O dia de detecção da rolha foi considerado o primeiro dia de gestação.

Imediatamente após detecção da rolha as fêmeas foram infectadas com 05 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Adicionalmente, fêmeas gestantes e não infectadas foram utilizadas como controle. Após 08 dias de gestação as fêmeas foram sacrificadas. Além disso, um grupo de fêmeas não gestantes foi utilizado como controle. Estas fêmeas foram infectadas ou não com 05 cistos de ME-49 e após 08 dias de infecção estas fêmeas foram sacrificadas.

Após sacrifício coletou-se o soro de todas as fêmeas além de útero gravídico e não-gravídico destes animais. O soro foi utilizado para dosagem de citocinas e NO. Os úteros foram utilizados para os ensaios de *western blotting*. Cada grupo experimental foi composto por 05 animais.

4.2.6. Sacrifício e coleta de material

Fêmeas dos grupos experimentais citados acima (não prenhes e não infectadas: NP/NI); (não prenhes e com 08 dias de infecção: NP/I); (08 dias de prenhez e não infectadas: P/NI); (08 dias de prenhez e 08 dias de infecção: P/I) foram anestesiadas intraperitonealmente com cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil), xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil). A seguir o sangue foi coletado do plexo retro-orbital e o soro foi obtido pela centrifugação do sangue a 500xg durante 5 minutos. Este soro foi então armazenado a -70°C até o momento de uso.

A seguir, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Sucessivamente, as fêmeas foram laparatomizadas e coletou-se os úteros

gravídicos ou não-gravídicos destes animais. Este material foi então congelado a -70°C para posterior análise por *western blotting*.

4.2.7. Quantificação protéica e reações de *western blotting*

Úteros gravídicos e não-gravídicos foram homogeneizados em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) [50 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1%) e SDS (0.1%); pH 7.5] adicionado de coquetéis de inibidores de protease (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemanha). O homogenato foi centrifugado a 15000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado para mensuração de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração total de proteínas (mg/mL) foi utilizada para determinar a concentração de proteínas nas reações de *western blotting*.

A seguir, 60 µg de proteínas obtidas de úteros gravídicos e não gravídicos infectados e não infectados provenientes de fêmeas C57BL/6 tipo selvagem e nocaute foram adicionados aos géis de eletroforese em concentrações apropriadas de acrilamida (SDS-PAGE). A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e estas então foram incubadas com solução de bloqueio (TBS – 3% de leite desnatado desidratado) por 1 hora. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo de camundongo anti-IDO (Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo de cabra anti-COX2 (Santa Cruz Biotechnology), *overnight* a temperatura ambiente. Na próxima etapa as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos de detecção: anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase ou anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase. Após incubação por 2 horas, as proteínas fosforiladas foram visualizadas pela reação de quimioluminescência. A intensidade das bandas foi quantificada em transluminador Chemi Doc-MP imaging (BIO-RAD Laboratories Inc, Hercules CA).

4.2.8. Quantificação de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array – CBA*)

Citocinas presentes no soro dos camundongos foram quantificadas usando o kit *Cytometric Bead Array*TM para detecção de citocinas de perfil Th1/Th2 de camundongo: IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF e IL-10 (CBA- BD Bioscience, San Jose, CA). Os soros dos animais experimentais foram adicionados a tubos apropriados para citometria de fluxo (tubos FACS). A seguir, adicionou-se aos tubos uma mistura de *beads* de captura de citocina e os respectivos anticorpos de detecção conjugados com ficoeritrina (PE). Os tubos foram incubados por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A seguir, os tubos foram centrifugados (400 x g durante 7 minutos) e os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados. O *pellet* contendo as *beads* revestidas com citocinas detectadas no sobrenadante de cultura foi resuspendido em tampão e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo em citômetro FACSCantoII BDTM (BD Company, San Diego, CA). Os dados foram analisados com uso de software BD FACSDivaTM. As concentrações de citocinas foram determinadas a partir de uma curva padrão, construída com concentrações conhecidas de citocinas de perfil Th1/Th2. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.2.9. Dosagem de óxido nítrico

Soros obtidos de animais de cada um dos nossos grupos experimentais foram utilizados para quantificação de NO pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Brevemente, amostras foram adicionadas a placas de 96 cavidades e misturadas na proporção de 1:1 com sulfanilamida (1%) e dicloridrato de n(1-naftil)-etilenodiamina - NEED (0.1%) em ácido fosfórico (H₃PO₄ -2.5%). A absorbância foi detectada em leitora de microplaca a 570nm e a concentração de NO foi determinada com base em uma curva de referência padrão de nitrito de sódio com concentração de 5 a 200 mol/L.

4.2.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como média de cinco experimentos para cada grupo. Dados não paramétricos foram analisados com base no teste *t* de Student. As comparações foram realizadas entre animais C57BL/6 tipo selvagem e C57BL/6 tipo MIF^{-/-}. Além disso, dentro de cada grupo de animais (selvagem ou nocaute) comparou-se animais infectados com animais não infectados e fêmeas prenhes com fêmeas não prenhes pelo teste *t* de Student. Todos os dados foram analisados usando software disponível comercialmente (Prisma, versão 4.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$).

4.2.11. Normas de biossegurança

Todos os experimentos, incluindo coleta de material biológico, utilização de reagentes e equipamentos, bem como manuseio e conduta com os animais foram realizados de acordo as normas de biossegurança, conforme descrito por Mineo e colaboradores (2005).

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS OBTIDOS DE EXPERIMENTOS *IN VITRO*

5.1.1. Expressão de CD74 em explantes placentários

Para verificar a expressão e localização do receptor de MIF em explantes de placenta de primeiro e terceiro trimestre, nós quantificamos o RNA mensageiro por PCR em tempo real e avaliamos a localização de CD74 por imuno-histoquímica. Verificamos que a expressão do receptor de MIF foi maior em explantes de primeiro trimestre quando comparado com os de terceiro trimestre (Figura 1A). Averiguamos por imuno-histoquímica que, nos explantes de primeiro trimestre o receptor de MIF que se localiza principalmente na região de sinciciotrofoblasto e células mesenquimais, tais como células de Hofbauer. Além disso, a imunomarcagem nestes tecidos foi intensa (Figura 1B) confirmando os achados da reação de PCR. Por outro lado, explantes de terceiro trimestre expressaram baixas quantidades de receptor de MIF, estes se localizam preferencialmente em células do citotrofoblasto e em células mesenquimais (Figura 1C).

5.1.2. Liberação de MIF por explantes placentários

Para verificar se os explantes placentários infectados por *T. gondii* ou tratados com diversos estímulos seria capaz de aumentar a secreção de MIF em relação aos controles não tratados e não infectados, nós mensuramos os níveis de MIF em sobrenadantes de cultura após 24 horas de tratamento. A seguir, nos comparamos a produção de MIF entre explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Conforme está mostrado na Figura 2, a produção de MIF em explantes de primeiro trimestre foi aumentada na presença de *T. gondii* quando comparada com o controle não tratado e não infectado ($P < 0,01$). Além disso, o estímulo com IFN- γ foi capaz de induzir elevados níveis de liberação de MIF ($P < 0,01$) semelhante aos resultados obtidos pela infecção por *T. gondii*.

Também observamos que a infecção associada a estimulação por IFN- γ induz uma grande liberação de MIF ($P < 0,001$). Além disso, a secreção de MIF não foi inibida por citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras, tais como, TGF β 1 e IL-10. A citocina MIF foi induzida, em vez de inibida, pela ação de TGF β 1 ou IL-10 quando associadas à infecção por *T. gondii* ($P < 0,001$), embora a liberação

de MIF tenha sido maior quando estas citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras se encontravam em concentrações menores.

Por outro lado, quantidades similares de MIF foram liberadas por explantes de terceiro trimestre infectados e controle (não tratados e não infectados) (Figura 2). O aumento da liberação de MIF foi observado somente na presença de IFN- γ seguida pela infecção por *T. gondii* ($P < 0,01$). Além disso, nós observamos uma tendência de aumento na liberação de MIF na presença de IL-12 ou IFN- γ .

Considerando a idade gestacional, nós observamos que a liberação de MIF foi mais intensa no primeiro trimestre em comparação ao terceiro trimestre quando os explantes estavam infectados por *T. gondii* ($P < 0,05$), assim como na presença de IL-10 (10ng/ml) ($P < 0,01$) ou TGF β 1 (1ng/ml), ($P < 0,05$).

5.1.3. Expressão de MIF por explantes placentários

Para verificar a expressão e localização de MIF em explantes placentários nós fizemos ensaios de imuno-histoquímica em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Nós observamos uma forte marcação para MIF em explantes de primeiro trimestre na condição controle (não tratados e não-infectados), sendo MIF localizados principalmente na camada de citotrofoblasto (Figura 3A). Por outro lado, explantes de primeiro trimestre infectados mostraram uma forte marcação para MIF na camada de sinciciotrofoblasto e células mesenquimais e fraca marcação na camada de citotrofoblasto (Figura 3B).

Em explantes de terceiro trimestre nós observamos fraca coloração na camada de citotrofoblasto nos explantes de tecidos não infectados (Figura 3C), sendo esta marcação mais intensa em explantes infectados, no entanto, diferente do que ocorreu no primeiro trimestre, a imunolocalização permaneceu nas células de citotrofoblasto tanto nos tecidos infectados quanto nos tecidos não infectados (Figura 3D).

5.1.4. Efeito de MIF no controle da infecção

Para determinar se MIF exerce alguma função para o controle da infecção por *T. gondii* em explantes de primeiro e terceiro trimestre, o parasitismo foi

quantificado pelo método de PCR em tempo real nestes tecidos. Para comparar o efeito de MIF com outras citocinas, os explantes foram tratados com IL-12, IFN- γ , TGF β 1 e IL-10 e o parasitismo nestes tecidos também foi quantificado. Comparado com tecidos não estimulados, o tratamento com MIF (25 e 100 ng/ml) em explantes de primeiro trimestre resultou em significativa redução da carga parasitária ($P < 0,001$) (Figura 3). Outras citocinas pro-inflamatórias (IL-12 e IFN- γ) também reduziam a infecção quando comparados com tecidos não estimulados ($P < 0,01$ e $P < 0,05$ respectivamente). Além disso, o estímulo com citocinas antiinflamatórias IL-10 (10 e 25 ng/ml) resultou em redução do parasitismo ($P < 0,01$ e $P < 0,05$ respectivamente).

Em comparação com os controles, os explantes de terceiro trimestre tratados com MIF só apresentaram redução do parasitismo quando tratados com a maior concentração desta citocina (100 ng/ml) ($P < 0,05$). O parasitismo também foi reduzido quando os tecidos foram estimulados com IL-12 ou TGF- β 1 ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente).

Quando as duas idades gestacionais foram comparadas, a função de MIF em controlar o parasitismo foi mais evidente em explantes de primeiro trimestre em comparação aos de terceiro trimestre ($P < 0,05$).

A seguir, foi analisada a relação entre a liberação de MIF e a carga parasitária tecidual. Nos explantes de primeiro trimestre o aumento da liberação de MIF após estímulo com IFN- γ e com as menores concentrações de IL-10 (10 ng/ml) ou TGF- β 1 (1 ng/ml) foi relacionado com um decréscimo na carga parasitária (Figura 4A). Quando as maiores concentrações de IL-10 (25ng/ml) ou TGF- β 1(10ng/ml) foram utilizadas observou-se uma redução na liberação de MIF que foi associada a um aumento na carga parasitária. Na presença de IL-12 ocorreu uma redução na liberação de MIF que foi acompanhada por um decréscimo no parasitismo em relação aos explantes não estimulados (Figura 4A).

Nos explantes de terceiro trimestre, a estimulação com IL-12 conduziu um leve aumento na liberação de MIF e um forte decréscimo na carga parasitária (Figura 4B). Um resultado oposto foi obtido para o tratamento com IFN- γ . Este tratamento conduziu a um alto nível de liberação de MIF associado com uma pequena redução na carga parasitária. O uso de concentrações crescentes de

MIF (10 e 25 ng/ml) resultou em decréscimo na liberação de MIF e aumento na carga parasitária. De modo oposto, o uso de concentrações crescentes de TGF- β 1 (1 e 10 ng/ml) resultaram em um aumento na liberação de MIF associado com um aumento no parasitismo (Figura 4B). A comparação dos resultados obtidos para primeiro e terceiro trimestre demonstrou relação oposta entre o parasitismo tecidual e liberação de MIF quando usamos concentrações crescentes de IL-10 (10 e 25 ng/ml) ou TGF- β 1 (1 e 10 ng/ml).

A seguir, para confirmar a associação entre idade gestacional e o parasitismo, ensaios de imuno-histoquímica foram realizados para quantificação e localização de parasitos em diferentes camadas das vilosidades coriônicas. Uma maior quantidade de parasitos foi observada na camada de trofoblasto do terceiro trimestre quando comparado com o trofoblasto de primeiro trimestre ($P < 0,01$). Além disso, parasitos presentes na região de mesênquima foram menos freqüentes em explantes de primeiro trimestre em comparação com explantes de terceiro trimestre ($P < 0,05$), (Figura 5A).

Nos explantes de primeiro trimestre os parasitos foram encontrados preferencialmente aderidos à camada de trofoblasto (Figura 5B), enquanto que nos tecidos de terceiro trimestre os parasitos foram encontrados preferencialmente dentro do trofoblasto e no tecido mesenquimal (Figura 5C).

5.1.5. Produção de Nitrito

Nenhuma produção de nitrito foi detectada em sobrenadantes de tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação para nenhuma das condições analisadas (dados não mostrados).

5.1.6. Modelo proposto para controle da infecção por *T. gondii* dependente de MIF em explantes de placenta

Um esquema de um modelo proposto para o controle da infecção por *T. gondii* dependente de MIF nos explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação está mostrado na figura 6. Nos explantes de primeiro trimestre e na ausência de infecção ou estimulação por citocinas, MIF foi amplamente expresso na camada de células citotroblásticas e existe uma grande quantidade de

receptor para MIF na camada de sinciotrofoblasto (Figura 6A). Após a infecção por *T. gondii* MIF foi liberado da camada de citotrofoblasto e se ligou ao seu receptor na camada de sinciotrofoblasto (Figura 6B). Esta interação pode ser importante para iniciar uma cascata de sinalização essencial para o controle do parasitismo. Como resultado desta interação, é possível perceber que uma pequena quantidade de parasitos alcança a circulação fetal (Figura 6C). Explantes de terceiro trimestre de gestação, na ausência de infecção ou estimulação são caracterizados por uma baixa expressão de MIF e também do receptor CD74 (Figura 6D). Após a infecção por *T. gondii* há um aumento na produção de MIF por células do citotrofoblasto, entretanto, não é possível observar aumento na liberação de MIF (Figura 6E). Conseqüentemente, a interação entre MIF e seu receptor é pouco estimulada o que provavelmente resulta em menor sinalização intracelular dependente de MIF. Conseqüentemente, é possível que um maior número de parasitos alcance os vasos sanguíneos fetais de modo a favorecer a transmissão congênita.

5.1.7. A sinalização das MAPK em explantes placentários é dependente da idade gestacional e independente da atividade de MIF

Na tentativa de entender a participação de MIF na ativação de respostas intracelulares envolvidas no controle da proliferação de *T. gondii* investigou-se a via de sinalização das MAPK. Para isso, explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação foram tratados com os seguintes inibidores das MAPK: SP600125 (inibidor da JNK); SB203580 (inibidor da P38); PD98059 (inibidor da ERK1/2) ou apiginina (4', 5, 7 – trihidroxiflavona), um potente antiinflamatório.

Em explantes de primeiro trimestre de gestação observou-se que o tratamento com qualquer um destes inibidores causou redução no índice de proliferação de *T. gondii*; sendo que somente o tratamento com MIF ou PD98059 induziu uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$), (Figura 7A).

Para averiguar se a inativação destas vias interfere com a produção de citocinas foram avaliadas a produção de IL-10, TGF β 1 e IL-13 nestes tecidos. Observou-se que estes inibidores não interferem de modo significativo com a produção de TGF β 1 e IL-13 (Figura 7B e 7C respectivamente). Entretanto, todos

os tratamentos causaram diminuição na liberação de IL-10 em comparação com os controles não tratados. Esta redução foi significativa para os tratamentos com MIF, PD98059, PD98059 adicionado de MIF, apigenina e apigenina adicionada de MIF ($P<0.05$), (Figura 7D).

A infecção por *T. gondii* em explantes de primeiro trimestre reduz significativamente a liberação de TGF β 1 e IL-13 em comparação aos respectivos controles não infectados ($P<0.0001$), (Figuras 7B e 7C respectivamente) e não altera de forma significativa a liberação de IL-10 (Figura 7D).

De maneira inversa, em explantes de terceiro trimestre de gestação o tratamento com os inibidores das MAPk e apigenina causaram aumento do parasitismo em comparação ao controle não tratado. Estas diferenças foram estatisticamente significativas na presença de SP600125 ($P<0.05$), apigenina ($P<0.05$), apigenina adicionada de MIF ($P<0.01$) (Figura 8A), ou ainda na presença de PD98059 adicionado de MIF ($P<0.05$), apigenina e apigenina adicionada de MIF ($P<0.01$) (Figura 8B).

Os tratamentos com os inibidores da sinalização intracelular não interferiram de modo significativo na produção de citocinas (Figuras 8C-E). Somente o tratamento com MIF foi capaz de aumentar significativamente a secreção de IL-13 ($P<0.05$), (Figura 8D) e de IL-10 ($P<0.05$), (Figura 8E).

De maneira interessante e inversamente oposta ao observado em explantes de primeiro trimestre, a infecção por *T. gondii* não alterou de modo significativo a secreção de TGF β 1 (Figura 8C), mas, provocou aumento significativo na secreção de IL-13 e IL-10 quando estes explantes foram comparados com os respectivos controles não infectados ($P<0.0001$), (Figura 8D e 8E respectivamente).

Em nenhum dos tratamentos com inibidores, em explantes de primeiro ou terceiro trimestre, a adição de MIF a estes inibidores foi capaz de reverter os resultados de parasitismo ou de liberação de citocinas de modo significativo (Figuras 7A-7D, 8A-8E).

Para averiguar se explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação são capazes de ativar a via das MAPk em resposta ao tratamento com MIF ou em resposta a infecção por *T. gondii* experimentos de cinética de fosforilação

das proteínas MAPk foram realizados em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação.

Para isso os explantes foram coletados e tratados ou não com MIF. A seguir, foram infectados ou não por *T. gondii* e novamente tratados ou não com MIF. Seguiu-se a coleta dos explantes placentários de acordo com a seguinte cinética: 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 24 horas. O extrato protéico destes tecidos foi avaliado quanto à fosforilação de ERK1/2, P38 e JNK.

Em explantes de primeiro trimestre, não tratados e não infectados, foi possível observar a fosforilação de ERK1/2 no primeiro horário analisado (10 minutos) e esta fosforilação persistiu por 24 horas. O tratamento com MIF não alterou este resultado. A infecção por *T. gondii* parece inibir a fosforilação de ERK1/2 em explantes de primeiro trimestre e a adição de MIF a este sistema não foi capaz de reverter este resultado (Figura 9A).

Resultados semelhantes foram obtidos em explantes de terceiro trimestre. A fosforilação de ERK1/2 foi mantida durante o período analisado (10 minutos a 24 horas) e esta fosforilação foi semelhante em explantes tratados ou não com MIF. Já a infecção por *T. gondii* diminuiu a fosforilação de ERK1/2 e esta redução foi mantida na presença de MIF (Figura 9B)

A seguir realizamos a imunolocalização de ERK1/2 em explantes de placenta de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a fosforilação de ERK1/2 ocorre preferencialmente em células citotrofoblásticas em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação (Figura 9C e D respectivamente).

O estudo da cinética de fosforilação de P38 mostrou que em explantes de primeiro trimestre de gestação, MIF induziu um aumento moderado na fosforilação de P38 em comparação com o controle não tratado. Este leve aumento foi mantido na presença de infecção por *T. gondii* ou quando a infecção foi seguida pelo tratamento com MIF (Figura 10A).

Já em explantes de terceiro trimestre de gestação o tratamento com MIF não alterou a fosforilação de P38 enquanto que a infecção por *T. gondii* causou redução na fosforilação de P38 na presença e na ausência de MIF (Figura 10B). A imunolocalização da p38 revelou que a fosforilação desta proteína ocorre

preferencialmente em células trofoblásticas em tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação (Figura 10C e 10D respectivamente).

Resultados semelhantes foram obtidos para a fosforilação de JNK. Em explantes de primeiro trimestre de gestação o tratamento com MIF causou leve aumento na fosforilação de JNK. Entretanto, a infecção com *T. gondii* levou a redução da intensidade de fosforilação de JNK nos explantes tratados ou não com MIF (Figura 11A).

Nos explantes de terceiro trimestre o tratamento com MIF não alterou a fosforilação de JNK enquanto que a infecção por *T. gondii* causou redução na intensidade de fosforilação na presença e na ausência de MIF (Figura 11B).

Para averiguarmos a imunolocalização da JNK fosforilada realizou-se ensaios de imunohistoquímica. Estes ensaios mostraram que a fosforilação de JNK ocorre preferencialmente em células do sinciciotrofoblasto e em algumas células mesenquimais tanto nos explantes de primeiro quanto nos de terceiro trimestre de gestação (Figura 11C e 11D respectivamente).

5.1.8. Imunolocalização da Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO) em explantes de placenta de primeiro e terceiro trimestre de gestação

Para imunolocalização da IDO ensaios de imuno-histoquímica foram realizados em cortes de tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Tanto em explantes de primeiro quanto de terceiro trimestre de gestação a IDO foi identificada no mesênquima (Figura 12A e 12B respectivamente) e somente em explantes de primeiro trimestre observou-se marcação para IDO em células trofoblásticas (dados não mostrados).

5.2. RESULTADOS OBTIDOS DE EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.2.1. CAMUNDONGOS MIF^{-/-} APRESENTAM MAIOR MORBIDADE EM COMPARAÇÃO AO CONTROLE SELVAGEM

Ainda com o objetivo de tentar esclarecer os mecanismos de ação de MIF na gestação associada à infecção por *T. gondii*, experimentos utilizando

camundongos MIF^{-/-} foram realizados em comparação com animais do tipo selvagem. Um ensaio de morbidade foi utilizado para determinação do número de cistos que seriam utilizados na infecção oral. Para isso camundongos C57BL/6 MIF^{-/-} e selvagem foram infectados com 5 ou 10 cistos via oral.

Nossos resultados mostraram que animais MIF^{-/-} ou selvagem, infectados com 5 ou 10 cistos sobrevivem mais de 21 dias; nenhuma mortalidade foi detectada durante o estes período. Animais do grupo MIF^{-/-} começaram a morrer com 68 dias pós-infecção enquanto que os animais do grupo selvagem começaram a morrer com 90 dias pós-infecção (dados não mostrados). Na análise de alteração do peso corporal dos animais em relação ao tempo zero (anterior à infecção) foi constatado que animais de todos os grupos apresentaram redução na média de peso em relação ao dia zero (Figura 13). Esta diferença foi estatisticamente significativa para os grupos C57BL/6 MIF^{-/-} e selvagem infectados com 10 cistos ($p= 0,0071$ e $p= 0,0235$ respectivamente) e para o grupo MIF^{-/-} infectado com 05 cistos ($p =0,0239$).

Ao compararmos a perda de peso no grupo C57BL/6 MIF^{-/-} em relação ao grupo selvagem averiguou-se que os animais C57BL/6 MIF^{-/-} perderam mais peso que os animais do tipo selvagem sendo esta diferença estatisticamente significativa para animais infectados com 10 cistos ($p <0,01$), (Figura 13).

5.2.2. A EXPRESSÃO DE IDO É MAIS INTENSA EM ANIMAIS MIF^{-/-} EM COMPARAÇÃO COM AO CONTROLE SELVAGEM

Conforme foi observado em nossos experimentos *in vitro* tecidos placentários expressam IDO de forma constitutiva. Para avaliar uma possível correlação entre a expressão de IDO e atividade de MIF foram coletados úteros de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} e selvagem nas seguintes condições experimentais: fêmeas não prenhes e não infectados (NP/NI); não prenhes e infectadas (NP/I); prenhes e não infectadas (P/NI); e, finalmente, prenhes e infectadas (P/I).

Foi constatado para ambos os grupos (C57BL/6 MIF^{-/-} e selvagem) que a expressão da IDO foi aumentada devido à prenhez e que a infecção leva a redução da expressão da IDO. Além disso, observou-se que para todas as condições experimentais (NP/NI, NP/I, P/NI, P/I) que animais MIF^{-/-} apresentam

maior expressão de IDO em comparação com o grupo controle tipo selvagem (Figura 14A e B).

5.2.3. A EXPRESSÃO DE COX-2 É MENOS INTENSA EM ANIMAIS MIF^{-/-} EM COMPARAÇÃO COM AO CONTROLE SELVAGEM

A seguir nós avaliamos a expressão de COX-2 em úteros de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} e selvagem nas mesmas condições experimentais descritas acima: NP/NI, NP/I, P/NI, P/I. Nós observamos que para ambos os grupos (C57BL/6 MIF^{-/-} e selvagem) a expressão da COX-2 foi induzida pela infecção por *T. gondii*. Além disso, foi possível constatar que animais do tipo selvagem apresentam maior expressão de COX-2 em resposta à infecção se comparados com animais do tipo MIF^{-/-} (Figura 15).

Para avaliar uma possível associação entre os dados de IDO e COX-2 os dados referentes à expressão destas duas proteínas foram plotados juntos. Nós observamos associação entre estes dados tanto para animais do grupo C57BL/6 selvagem quanto para os animais MIF^{-/-}, ou seja, estas duas proteínas são expressas em proporção inversa nos úteros de C57BL/6. Assim, quanto maior a expressão da IDO menor será a expressão da COX-2 e vice-versa (Figura 15).

5.2.4. A RESPOSTA DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS FRENTE À INFECÇÃO É ALTERADA EM ANIMAIS MIF^{-/-} EM COMPARAÇÃO AO CONTROLE SELVAGEM

Para avaliar o perfil de citocinas frente à infecção e à gestação em animais C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação com animais do grupo selvagem foi avaliada a produção de citocinas de perfil Th1/Th2 no soro destes animais. Foi possível averiguar que tanto os animais C57BL/6 MIF^{-/-} quanto os animais do tipo selvagem respondem à infecção aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- γ e TNF), (Figura 16 A-C).

Um aumento significativo na secreção de IL-6 nos animais do tipo selvagem foi observado quando fêmeas prenhes não infectadas foram comparadas com as fêmeas prenhes infectadas ($p < 0,0001$). Para os animais MIF^{-/-} uma diferença estatisticamente significativa foi observada em fêmeas não prenhes. Neste grupo, os valores foram significativos quando fêmeas infectadas foram comparadas com fêmeas não infectadas ($p = 0,0018$), (Figura 16A).

Com relação ao $\text{IFN}\gamma$ foi observado um aumento significativo na secreção desta citocina frente à infecção por *T. gondii*. Estes valores foram significativos na comparação entre fêmeas não-prenhes infectadas versus não infectadas, tanto para animais C57BL/6 do tipo selvagem quanto animais do grupo C57BL/6 $\text{MIF}^{-/-}$, ($p=0,0073$ e $p<0,0001$ respectivamente). Valores significativos também foram obtidos na comparação entre fêmeas prenhes infectadas versus não infectadas, tanto para animais C57BL/6 do tipo selvagem quanto animais do grupo C57BL/6 $\text{MIF}^{-/-}$ ($p<0,0001$ e $p=0,0004$ respectivamente), (Figura 16B).

O mesmo padrão de resposta foi observado para TNF, ou seja, um aumento de produção de TNF frente à infecção em comparação com animais não infectados. Estes valores também foram significativos na comparação entre fêmeas não-prenhes infectadas versus não infectadas, tanto no grupo de C57BL/6 do tipo selvagem quanto no grupo de C57BL/6 $\text{MIF}^{-/-}$ ($p= 0,0011$ e $p<0,0028$ respectivamente). Diferenças significativas também foram obtidas na comparação entre fêmeas prenhes infectadas versus não infectadas no grupo de animais C57BL/6 do tipo selvagem e $\text{MIF}^{-/-}$ ($p<0,0001$ e $p=0,261$ respectivamente), (Figura 16C).

Ao compararmos a secreção de citocinas pró-inflamatórias nos animais do grupo selvagem em relação ao grupo $\text{MIF}^{-/-}$ foi possível observar que esta secreção foi sempre menor no grupo $\text{MIF}^{-/-}$ se comparado ao grupo controle do tipo selvagem. Para produção de IL-6 esta diferença foi significativa ao compararmos fêmeas prenhes e infectadas destes dois grupos ($p= 0,002$). Para a produção de $\text{IFN}\gamma$ a diferença entre $\text{MIF}^{-/-}$ e selvagem foi observada tanto para o grupo de fêmeas prenhes e não infectadas quanto para o grupo de fêmeas prenhes e infectadas ($p= 0,007$ e $p= 0,032$ respectivamente). Com relação à secreção de TNF a comparação entre selvagem e $\text{MIF}^{-/-}$ só foi significativa no grupo de fêmeas prenhes e infectadas ($p=0.011$), (Figura 16A-C).

Por outro lado, ao avaliarmos a secreção de citocinas de perfil antiinflamatório (IL-4 e IL-10) nós observamos que a secreção destas citocinas quase não é alterada no grupo de animais do tipo selvagem. Estes valores permanecem praticamente inalterados quando comparamos fêmeas prenhes com fêmeas não prenhes ou mesmo ao comparamos fêmeas infectadas com fêmeas não infectadas. Diferentemente, ao avaliarmos o grupo de fêmeas $\text{MIF}^{-/-}$

foi possível observar que houve um aumento na produção de citocinas antiinflamatórias (IL-4 e IL-10) frente à prenhez. Estes valores foram estatisticamente significativos somente para a secreção de IL-4, mostrando que a prenhez causou aumento na secreção de IL-4 quando as fêmeas não estavam infectadas ($p=0,041$). Ainda com relação à secreção de IL-4, nós observamos que ao compararmos fêmeas prenhes e não infectadas entre animais do grupo MIF^{-/-} e selvagem a secreção de IL-4 foi maior no grupo MIF^{-/-} em relação ao selvagem ($p= 0,028$), (Figura 16D-F).

Nenhuma diferença estatística foi obtida na análise de citocinas quando comparamos fêmeas prenhes e infectadas com fêmeas prenhes e infectadas que sofreram aborto. Estes valores não foram diferentes no grupo C57BL/6 selvagem nem no grupo C57BL/6 MIF^{-/-} (Figura 16 A-E).

5.2.5. A PRODUÇÃO DE NO EM ANIMAIS MIF^{-/-} NÃO SOFRE ALTERAÇÕES QUANDO COMPARADA AOS ANIMAIS CONTROLE TIPO SELVAGEM

Ainda na tentativa de esclarecermos o papel de MIF na infecção e gestação foi avaliada a secreção de NO em soros de animais do grupo C57BL/6 tipo MIF^{-/-} e selvagem. Nós observamos no grupo de animais tipo selvagem que há uma tendência de aumentar a secreção de NO frente à infecção. Entretanto, estes valores não foram estatisticamente significativos. Por outro lado, em animais do grupo MIF^{-/-} a secreção de NO foi reduzida frente à infecção por *T. gondii* tanto em fêmeas prenhes quanto em fêmeas não prenhes. Entretanto, estes valores não foram estatisticamente significativos.

Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas somente na comparação entre fêmeas selvagem e MIF^{-/-} para o grupo de animais não-prenhes e infectados ($p<0.05$), (Figura 17).

DISCUSSÃO

Células trofoblásticas são importantes componentes da placenta envolvidas na prevenção da transmissão vertical de patógenos, uma vez que este tipo de célula representa a principal barreira na interface materno-fetal (BOYD, HAMILTON, 1970). Entretanto, esta barreira pode ser freqüentemente desafiada e vencida por certos microorganismos, como *T. gondii*, resultando em potencial infecção fetal. Os mecanismos de transmissão transplacentária de *T. gondii* são ainda largamente desconhecidos, principalmente com relação ao controle da invasão e replicação de *T. gondii* em células trofoblásticas.

No presente estudo foram empregados explantes de primeiro e terceiro trimestre para analisar a resposta do trofoblasto à infecção por *T. gondii*. Os resultados obtidos mostraram que a expressão do receptor de MIF em explantes infectados é dependente da idade gestacional. A expressão de CD74 é mais intensa em explantes de primeiro trimestre em comparação aos explantes de terceiro trimestre. Estudos prévios mostraram que células trofoblásticas da linhagem Jar e explantes de terceiro trimestre expressam CD74 constitutivamente (RANELLA et al., 2005).

Além disso, nossos resultados mostraram que a secreção de MIF foi regulada positivamente em explantes de primeiro trimestre infectados por *T. gondii* quando comparados com explantes controle (não tratados e não infectados). Nós também demonstramos que IFN- γ foi uma citocina chave requerida para a secreção de MIF quando os explantes estavam infectados ou não por *T. gondii*. Um estudo prévio de nosso grupo demonstrou que explantes de placenta de primeiro trimestre estimulados somente por antígeno solúvel *T. gondii* ou na presença de IFN- γ induziram a secreção de MIF (FERRO et al., 2008). Nós também observamos que MIF foi estimulada em vez de inibida em explantes infectados adicionados de citocinas antiinflamatórias ou reguladoras (TGF- β 1, IL-10), outros estudos suportam os dados obtidos no presente trabalho. De acordo com Flaster e colaboradores (2007) MIF é um mediador regulatório único que tem a habilidade de sustentar uma resposta inflamatória mesmo na presença de efeitos antiinflamatórios endógenos ou exógenos. De maneira oposta, nossos resultados mostraram que a liberação de MIF em explantes de terceiro trimestre não foi positivamente regulada pela presença de *T. gondii*;

embora a liberação de MIF tenha aumentado em explantes de terceiro trimestre infectados e estimulados com IFN- γ .

Avaliando os resultados de liberação de MIF do presente estudo com base na idade gestacional, nós demonstramos que as principais diferenças entre explantes de primeiro e terceiro trimestre ocorrem na presença de infecção ou infecção associada com estímulo por TGF- β 1 ou IL-10. Baixas concentrações de citocinas antiinflamatórias e reguladoras induzem a secreção de MIF nos explantes de primeiro trimestre enquanto este efeito não ocorre em explantes de terceiro trimestre. Entretanto, sob o estímulo com IFN- γ , a liberação de MIF ocorreu de maneira mais intensa em explantes de terceiro trimestre que explantes de primeiro trimestre. É provável que estes resultados referentes à liberação de MIF em explantes estimulados com IFN- γ estejam associados às diferenças de expressão de receptor para IFN- γ em idades gestacionais distintas. De acordo com Banerjee e colaboradores (2005) o efeito de IFN- γ na ativação de linfócitos T é influenciado pela densidade relativa de seus dois receptores, com particular importância para o receptor de IFN γ tipo 2 (IFN γ R2). Banerjee e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão do gene *IFNGR2* foi maior em estágios finais de gestação quando comparados com estágios iniciais da gestação.

Além disso, nossos resultados mostraram que a imunomarcção para MIF foi mais forte em explantes de placentas de primeiro trimestre que em placentas de terceiro trimestre, quando estes tecidos não estavam infectados. Esta imunomarcção foi especialmente forte na camada de citotrofoblasto. Interessantemente, a infecção causou alteração do sítio de imunomarcção para MIF em explantes de primeiro trimestre. Nestes tecidos infectados, MIF foi localizado preferencialmente na camada de sinciotrofoblasto e esta localização coincide com aquela observada para o receptor de MIF. Portanto, nós sugerimos que a infecção, nos explantes de primeiro trimestre, foi importante estímulo para induzir a secreção de MIF, já que MIF foi detectado no sobrenadante de cultura pelos ensaios de ELISA. É provável que, MIF tenha sido secretado em resposta à infecção e a seguir tenha se associado ao seu receptor conduzindo a uma cascata de sinalização em resposta à infecção. De forma diferente, a infecção por *T. gondii* em explantes de terceiro trimestre foi capaz de induzir maior

produção de MIF. Estes dados foram obtidos da imunomarmacação no citototrofoblasto que foi mais intensa em tecidos de terceiro trimestre infectados comparados aos tecidos não infectados. Entretanto, a infecção por *T. gondii* nestes tecidos não induziu a secreção de MIF, conforme demonstrado pelo ensaio ELISA.

O conhecimento sobre a redução do número de camadas de células trofoblásticas com o progresso da gestação está bastante consolidado na literatura (BOYD, HAMILTON, 1970). Esta informação suporta os dados do nosso estudo a respeito da redução da secreção de MIF e expressão do respectivo receptor durante o curso da gestação. Conforme demonstrado em nosso trabalho as células trofoblásticas são as principais células do vilos placentários responsáveis por expressar MIF e seu receptor. A redução do número de camadas de células trofoblásticas com o curso da gestação pode ter relação direta com a menor expressão de MIF e seu receptor em explantes de terceiro trimestre, conforme foi observado em nosso estudo.

Nossos próximos resultados demonstraram que o estímulo com MIF exógeno foi capaz de induzir uma redução no parasitismo em explantes de primeiro trimestre. Uma atividade protetora para MIF vem sendo proposta em diversos modelos de infecção devido à sua atividade pró-inflamatória em células infectadas por bactérias (CANIGGIA et al., 1997; KOEBERNICK et al., 2002), vírus (DELALOYE et al., 2012), fungos (STOJANOVIC, et al., 2011) e protozoários (JUTTNER et al., 1998; REYES et al., 2006; FLORES et al., 2008; TERRAZAS, et al., 2010, CASTRO et al., 2013).

MIF é uma citocina pró-inflamatória antiga que participa da resposta imune inata e adaptativa e é altamente conservada em múltiplas espécies (CALANDRA, ROGER, 2003; LARSON, HORAK, 2006; KUDRIN, RAY, 2008). Uma proteína homóloga de MIF tem sido descrita em muitas espécies de parasitos incluindo *Plasmodium*, *Leishmania*, *Brugia*, *Clostridium* e *Eimeira*. Estes estudos implicam que a presença de MIF homólogo nestas espécies de parasitos pode estar associada com a manipulação da resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção (AUGUSTIJN et al, 2007; KAMIR et al, 2008; RICHARDSON, et al., 2009; ZANG et al, 2002; JANG et al., 2011). Recentemente, foi demonstrada a presença de MIF homólogo no genoma de *T. gondii* que é imunologicamente e

enzimaticamente ativo *in vitro*. Estes achados sugerem que esta proteína neste parasito tenha função em modular a resposta imunológica do hospedeiro, potencialmente por exercer seus efeitos ao interagir com o receptor humano para MIF, CD74. Consequentemente, a presença de MIF em *T. gondii* poderia ser importante para iniciar uma resposta imunológica capaz de limitar a severidade da infecção, o que poderia ser benéfico para a sobrevivência do hospedeiro. Desta forma, esta proteína teria potencial de criar um ambiente favorável para uma interação parasito-hospedeiro de longa duração. (SOMMERVILLE, et al., 2013).

A expressão de MIF em células trofoblásticas requer a interação com outras citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ (FERRO et al., 2008). Subseqüentemente, MIF atua por se ligar ao seu complexo de receptores (CD74 – CD44) (RANELLA et al., 2005; SHI et al., 2006) ativando vias de transdução de sinal (MITCHELL, et al., 1999) e ativando a transcrição gênica e expressão de moléculas efetoras tais como citocinas (REYES et al., 2006) e moléculas de adesão (FERRO, et al., 2008). A atividade pró-inflamatória de MIF para o controle da infecção de *T. gondii* foi demonstrada por Flores e colaboradores (2008). Neste estudo camundongos MIF^{-/-} exibiram maior dano hepático, mais cistos no tecido cerebral e menor produção de citocinas pró-inflamatórias e sucumbiram à infecção mais rápido que os animais do tipo selvagem. Estes dados indicaram que MIF desempenha uma função crítica em mediar a resistência do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* (FLORES, et al., 2008).

Além disso, um estudo de nosso grupo de pesquisa demonstrou que MIF produzido no sobrenadante de células BeWo foi capaz controlar a proliferação de *T. gondii* em células de linhagem monocítica (THP-1) e que o tratamento de células THP-1 com MIF recombinante foi capaz de reduzir o parasitismo de maneira dose dependente neste tipo celular. Com base nestes resultados foi proposto que fatores secretados por células trofoblásticas de linhagem BeWo são capazes de modular a atividade de monócitos na interface materno-fetal e desta forma contribuir para o controle da infecção e conseqüente manutenção da gestação (CASTRO et al., 2013). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho que demonstram que MIF é um importante fator capaz de controlar a proliferação de *T. gondii* em explantes

placentários, minimizando a chance de transmissão congênita principalmente em estágios iniciais da gestação.

Nosso grupo foi o primeiro a associar MIF com a toxoplasmose congênita, embora o mecanismo completo responsável por mediar esta proteção ainda precisa ser melhor esclarecido (FERRO, et al., 2008). É provável que o mecanismo de controle seja independente de NO uma vez que NO não foi detectado em nossos experimentos, mesmo após a estimulação com MIF. Estes dados estão de acordo com outros modelos experimentais que demonstraram que NO não é detectada em grandes quantidades em sistemas humanos (MASEK et al., 2002) .

O baixo índice de infecção observado em nossos experimentos com explantes de primeiro trimestre pode estar relacionado com a função particular de MIF que medeia um perfil pró-inflamatório mesmo na presença de fatores imunossupressivos, tais como, hormônios (FLASTER et al., 2007). Em contraste, este tipo de atividade protetora não foi observado em explantes de terceiro trimestre.

Além disso, células trofoblásticas de terceiro trimestre foram incapazes de aumentar a secreção de MIF frente à infecção por *T. gondii*. Em nosso estudo nós observamos a integridade estrutural dos explantes cultivados na presença de *T. gondii*. De acordo com Miller e colaboradores (MILLER, et al., 2005) o estudo da morfologia pode ser considerado um dos mais importantes testes para acessar a viabilidade *in vitro*. Portanto, a possibilidade de que a ausência de regulação positiva de MIF em explantes de terceiro trimestre esteja associada com a inviabilidade destes tecidos pode ser descartada. Provavelmente, a redução do número de camadas de células trofoblásticas em explantes de terceiro trimestre pode estar associada com a menor expressão de MIF e de seu receptor nestes tecidos conduzindo aos resultados obtidos no presente estudo de que explantes de terceiro trimestre são menos responsivos à infecção por *T. gondii*.

Está bem documentado na literatura que a toxoplasmose congênita é mais freqüente quando a mãe adquire a infecção durante os últimos estágios da gestação (DESMONTS et al., 1974). Nossos resultados suportam esta evidência epidemiológica, uma vez que nós observamos que o número de parasitos

obtidos no trofoblasto e mesênquima foi maior em explantes de terceiro trimestre que em explantes de primeiro trimestre. Biologistas reprodutivos têm, por longo tempo, interesse nas diferenças de suscetibilidade durante o curso da gestação. A questão envolvendo esta função é se a placenta exerce sua função devido às suas características estruturais ou se a placenta desempenha uma função mais ativa por induzir uma resposta imunológica contra patógenos.

Foi proposto que as diferenças estruturais na placenta durante o curso da gestação, especialmente devido à redução no número de camadas de células que se interpõem entre a circulação materna e fetal, poderiam mediar esta diferença (LOKE et al., 1982). De fato, a redução das camadas celulares na placenta parece estar relacionada com a diminuição da secreção de MIF e expressão de seu receptor, como foi observado no presente estudo. Entretanto, nós não acreditamos que as diferenças no índice de infecção sejam devido à barreira física. *T. gondii* é um parasito ativo capaz de atravessar inúmeras barreiras biológicas, espalhando por muitos órgãos, incluindo o cérebro (BARRAGAN, et al., 2002; LACHENMAIER, et al., 2011). Nós sugerimos que variações na regulação de MIF durante o curso gestacional desempenham uma importante função para suscetibilidade diferencial à *T. gondii* em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação.

Na tentativa de entender os mecanismos de ação de MIF para promover o controle da infecção de *T. gondii* em explantes placentários foi investigada a via de sinalização intracelular das MAPk em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Estudos sugerem que as atividades mediadas por MIF podem estar associadas a vias complexas de transdução de sinal (XU et al., 2013). MIF promove proliferação celular por ativar membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPk) gerando ativação sustentada de ERK1/2 por meio de transdução de sinal mediada por receptor de membrana CD74, (KYRIAKIS, 2009; MITCHELL et al., 1999). Uma vez que ERK1/2 é ativada, esta proteína conduz a ativação de proteínas citosólicas e da fosfolipase A2 citoplasmática (cPLA2), que é um importante componente da cascata pró-inflamatória. cPLA2 conduz à produção de ácido araquidônico (AA) que é precursor da síntese de prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, o AA ativa a JNK que

contribui para a eficiente translocação de RNAm para síntese de $\text{TNF}\alpha$ e outras citocinas (SWANTEK et al., 1997).

No presente trabalho se empregou duas metodologias para averiguar a possível participação da sinalização intracelular de MAPk no controle da infecção mediada por MIF. Para alcançar este objetivo as vias de sinalização das MAPk foram inibidas com uso de inibidores para fosforilação de ERK1/2, JNK e p38. Adicionalmente, os inibidores foram utilizados na presença de MIF. Além disso, explantes de placentas tratados com MIF foram avaliados quanto à cinética de fosforilação de MAPk.

Entretanto, nossos resultados mostraram que a ativação das MAPk não foi importante em mediar o controle do parasitismo em explantes de primeiro trimestre, já que a inibição destas vias nestes tecidos não ocasionou aumento e sim inibição da proliferação de *T. gondii*. Além disso, a inibição destas vias causou redução na secreção de citocina antiinflamatória: IL-10. Assim, é provável que a ação de MIF em controlar o parasitismo em explantes de primeiro trimestre seja independente da sinalização via MAPk ou as concentrações de inibidores utilizadas no presente trabalho não foram suficientes.

De maneira oposta em explantes de terceiro trimestre a inibição das MAPk, especialmente a inibição ERK1/2 ocasionou aumento do parasitismo, demonstrando que, para tecidos de terceiro trimestre a fosforilação de MAPk pode estar envolvida no controle do parasitismo. Além disso, na presença de apiginina, um potente agente antiinflamatório, também foi observado um aumento do parasitismo. Entretanto, o tratamento com MIF não foi capaz de reverter esta condição de aumento de parasitismo; sugerindo que a ativação das MAPk nestes tecidos não seja mediado por MIF. Outra hipótese seria que esta sinalização seja mediada por MIF endógeno não havendo sítios de ligação disponível para a ligação do MIF exógeno em seu receptor. Nossos resultados também mostraram que inibição das vias das MAPk não causou alteração na produção de citocinas antiinflamatórias e reguladoras ($\text{TGF-}\beta 1$, IL-13 e IL-10) em explantes de terceiro trimestre. Desta forma, o aumento do parasitismo devido à inibição das MAPK não se relaciona a hipersecreção de nenhuma desta citocinas.

O aumento do parasitismo na presença de apiginina pode estar relacionado com a inibição da atividade inflamatória nestes tecidos. Wang e Huang (2013)

demonstraram que a apiginina é capaz de reverter a resposta inflamatória causada por *Helicobacter pylori* em células de linhagem gástrica. Nestas células a apiginina atua por prevenir a degradação do inibidor kappa B (I κ B) e conseqüentemente evita a translocação do NF κ B para o núcleo. De acordo com estes pesquisadores, a conseqüência deste processo é uma redução de produção de mediadores inflamatórios tais como: COX-2, ICAM-1, ROS, IL-6 e IL-8. É provável que no presente estudo o aumento do parasitismo na presença da apiginina também esteja relacionado com a redução da resposta inflamatória. Embora MIF não tenha sido capaz de reverter esta condição fica mais uma vez demonstrado que uma resposta inflamatória seja importante para mediar o combate à infecção. Além disso, fica mais uma vez demonstrado que o aumento do parasitismo com o avanço da gestação pode estar relacionado com mudanças no perfil inflamatório destes tecidos.

Embora a inibição da via das MAPk não tenha ocasionado importantes alterações na secreção de citocinas nestes tecidos, outra informação importante pôde ser extraída destes dados de citocinas obtidos no presente trabalho. A secreção de citocinas nestes tecidos mostrou um perfil bastante interessante que parece estar associado à idade gestacional. Em explantes de primeiro trimestre a infecção por *T. gondii* ocasionou uma regulação negativa na secreção citocinas antiinflamatórias (TGF β 1 e IL-13). De maneira oposta, em explantes de terceiro trimestre a infecção conduziu à regulação positiva de citocinas antiinflamatórias (IL-13 e IL-10). Estes resultados corroboram com a hipótese de que a resposta imunológica ao *T. gondii* em tecidos placentários é dependente da idade gestacional.

Em explantes de primeiro trimestre a regulação negativa de citocinas antiinflamatórias pode favorecer o controle do parasitismo e confirmam os dados epidemiológicos que indicam menor chance de transmissão congênita nesta idade gestacional (DESMONTS et al., 1974). Por outro lado, a regulação positiva de citocinas antiinflamatórias em explantes de terceiro trimestre demonstra a tendência de um perfil mais compatível com a gestação e menos favorável para controlar o parasitismo nesta idade gestacional. Estes dados, mais uma vez corroboram com informações epidemiológicas de que em fases finais da gestação é maior a chance de transmissão congênita de *T. gondii* (DESMONTS et al., 1974).

Nossos resultados referentes à cinética de fosforilação de MAPk demonstraram que a fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 ocorre de forma sustentada

na presença ou ausência de MIF exógeno em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Já a infecção por *T. gondii* levou a redução da fosforilação das MAPk e esta condição não pode ser revertida na presença de MIF exógeno.

Estes resultados mais uma vez apontam que o MIF exógeno não foi capaz de modular a sinalização das MAPk em tecidos placentários de terceiro trimestre. É provável que a ativação desta via seja mediada por outros fatores ou mesmo pelo MIF endógeno de modo a contribuir para a fisiologia normal do trofoblasto e para o controle da infecção. A importância de ERK1/2 e p38 MAPk no funcionamento e diferenciação de tecidos placentário foi demonstrado por Daoud e colaboradores (2005). Estes autores demonstraram que células citotrofoblásticas fosforilam ERK1/2 e p38 quando cultivadas na presença de soro bovino fetal. O tratamento destas células com inibidores de fosforilação de ERK1/2 e p38, PD98059 e SB203580 respectivamente, suprimiu o processo de diferenciação do trofoblasto. Estes autores concluíram que a ativação destas vias participa do funcionamento normal da placenta e que a ausência da fosforilação destas vias pode estar relacionada com casos patológicos tais como pré-eclampsia e neoplasia trofoblástica (DAOUD et al., 2005; MOON et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a redução da fosforilação das proteínas da família das MAPKs na presença de *T. gondii* em tecidos placentários. Estes resultados indicam que uma possível estratégia de evasão do parasito contra a ativação de uma resposta imunológica robusta capaz de eliminar o parasito.

T. gondii é considerado um manipulador mestre da resposta imunológica de seus hospedeiros (DENKERS et al., 2004). Desta forma, *T. gondii* evita a indução de uma resposta inflamatória robusta capaz de conduzir a eliminação deste parasito (HILL, DUBEY, 2002). *T. gondii* é capaz de manipular a resposta imunológica do hospedeiro em diversos níveis (DENKERS et al., 2004). Um exemplo disso é a capacidade deste parasito de bloquear temporariamente a translocação nuclear de NFkB (BUTCHER et al., 2001; SHAPIRA et al., 2002, DONG et al., 2002). Além disso, as cascatas de sinalização para a resposta pró-inflamatória são um importante alvo de manipulação destes parasitos, visto que *T. gondii* é capaz interferir com as vias de sinalização que conduzem a ativação de MAPk (KIM et al., 2004). *T. gondii* é capaz de desativar as MAPk por induzir fosfatases de dupla

especificidade que são seletivas em desfosforilar resíduos de fosfotreonina e fosfotirosina dentro do grupo de MAPks (CAMPS et al., 2000; ROPERT et al., 2003; CHEN et al, 2002). Embora ocorra uma ativação transitória de MAPk em tecidos infectados por *T. gondii*, uma subsequente desativação destas vias pode estar associada com a prevenção da síntese de IL-12 e TNF α como mecanismo de escape da resposta imunológica (WYSK et al., 1999).

É provável que os resultados obtidos no presente trabalho referentes à diminuição da fosforilação em explantes infectados façam parte de conjunto de estratégias que o parasito utiliza para evadir da resposta imunológica do hospedeiro. Assim, é provável que outros mecanismos estejam envolvidos no controle da infecção mediado por MIF, especialmente em tecidos de primeiro trimestre onde este controle se mostrou mais efetivo.

Ainda na tentativa de esclarecer os possíveis mecanismos desencadeados por MIF para o controle da proliferação de *T. gondii* nós utilizamos um modelo de animais MIF^{-/-} em comparação com animais do tipo selvagem.

Inicialmente nós avaliamos o comportamento destes dois grupos de animais frente à infecção com 05 e 10 cistos da cepa ME-49. Nós observamos que os animais do grupo MIF^{-/-} sofrem maiores danos frente à infecção por *T. gondii* se comparados com animais do tipo selvagem. Estes resultados estão de acordo com Flores e colaboradores (2007) que demonstraram MIF é crítico na resistência contra infecção por *T. gondii*. Estes autores observaram que animais MIF^{-/-} da linhagem Balb/c apresentaram maiores quantidades de cistos cerebrais, patologia hepática mais acentuada e sucumbiram à infecção de forma mais acelerada quando comparados com animais do tipo selvagem. Além disso, estes autores demonstraram que os animais de linhagem C57BL/6, mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*, produzem menores quantidades de MIF que animais da linhagem Balb/c, que são mais resistentes à infecção. Estes dados mais uma vez demonstram a importância de MIF no controle da infecção por *T. gondii* (FLORES et al., 2007).

Nosso próximo passo foi determinar se a IDO, uma enzima responsável por catabolizar o triptofano na via da quinurenina, seria expressa de modo diferencial em animais do grupo MIF^{-/-} e selvagem. Nossos experimentos *in vitro* haviam demonstrado que a IDO foi expressa de forma constitutiva em tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação, sendo esta imunomarcção prevalente em células

mesenquimais. Em camundongos IDO é expressa em células trofoblásticas gigantes da zona de labirinto (HANSEN et al., 2004, BABAN et al., 2004) e células estromais na decídua (MACKLER et al., 2003).

Nossos resultados demonstram que animais MIF^{-/-} expressam maiores quantidade de IDO quando comparados com animais do grupo selvagem. Além disso, úteros de fêmeas prenhes expressaram maiores quantidades de IDO que os úteros de fêmeas não-prenhes. Finalmente, a infecção ocasionou a supressão da IDO no grupo de fêmeas prenhes ou não prenhes, tanto nos animais selvagem quando MIF^{-/-}.

A IDO é uma enzima que desempenha diversas funções na regulação imunológica, defesa contra patógenos e homeostase fisiológica. É uma enzima constitutivamente expressa durante a gestação sendo indispensável para o sucesso gestacional (MUNN et al., 1998, KUDO, BOYD, 2000). A atividade homeostática da IDO durante a gestação parece estar associada com a degradação do trp um aminoácido importante para inúmeras atividades fisiológicas dentre elas, a ativação, crescimento e sobrevivência de linfócitos T (SCHMIDT et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a IDO exerce um importante papel na diferenciação de células TCD4⁺ em células Treg FOXP3⁺ (FALLARINO et al., 2006). Juntos estes dados suportam a idéia do importante papel da IDO em gerar um microambiente de imunoprevilégio compatível com o sucesso da gestação (DONG et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, MIF exerce importante papel em inibir a ativação da IDO, já que animais MIF^{-/-} apresentaram maior expressão de IDO que animais do grupo selvagem. Estes resultados são consistentes com a função de MIF que é capaz de exercer uma resposta inflamatória mesmo na presença de fatores antiinflamatórios, tais como os hormônios da gestação (FLASTER et al., 2007).

Além disso, nossos resultados mostraram aumento na expressão de IDO frente à gestação. Estes dados demonstram uma possível correlação com a manutenção de uma resposta preferencialmente de perfil Th2, compatível com o sucesso gestacional. Assim, a expressão sustentada da IDO geralmente resulta em um estado de imunotolerância ao feto, um enxerto semi-alogênico que desenvolve dentro do organismo materno (DÜRR, KINDLER, 2013). Estudos *in vitro* mostram que linfócitos T derivados do sangue periférico de indivíduos saudáveis cultivados

em meio sem trp estacionam em fases finais de G1 do ciclo celular e não proliferam (MUNN et al., 1999; e TSE et al., 2003). Esta inibição pode ser evitada pela adição de trp ao meio de cultura ou pela adição de inibidores da IDO em culturas de células expressando IDO na forma ativa (RUBIN, et al., 1991; MUNN et al., 2005; MUNN et al., 1999).

Por outro lado, a sustentação de um estado de imunotolerância devido à inibição de linfócitos T pode favorecer inúmeras infecções (DÜRR, KINDLER, 2013). Desta forma, conforme observado no presente trabalho, a infecção por *T. gondii* leva a uma redução na expressão da IDO favorecendo o perfil de resposta do tipo Th1 capaz de conduzir ao controle da infecção. Assim, os dados apresentados no presente estudo suportam a idéia de que MIF é capaz de suprimir a expressão da IDO de modo a garantir o controle da proliferação de *T. gondii* nestes tecidos mesmo na presença de fatores imunossupressores inerentes à gestação.

A seguir, nós avaliamos a expressão da COX-2 em úteros de fêmeas prenhes e não prenhes; infectadas ou não infectadas nos grupos de animais MIF^{-/-} ou selvagem. Estes valores foram então plotados junto com os dados obtidos para expressão da IDO para investigarmos a possível associação entre estes parâmetros.

Nossos resultados demonstraram que IDO e COX-2 são expressos de modo inversamente proporcional. Assim, animais MIF^{-/-} que expressaram IDO em maiores quantidades em relação ao controle selvagem apresentaram menor expressão de COX-2. Estes dados são consistentes com a hipótese gerada no presente trabalho: MIF é um importante fator capaz de inibir a atividade da IDO e desencadear uma resposta inflamatória via expressão de COX-2. A COX-2 é uma enzima associada com a produção de vários mediadores biológicos tais como prostaglandinas E2 (PGE2), tromboxano B2 e protaciclina que causam proliferação celular, angiogênese e inibição de apoptose conduzindo a uma resposta imunológica de perfil pro-inflamatório (GEE et al., 2008; GHOSH et al., 2010).

Finalmente nós avaliamos se o perfil de citocinas no soro de animais MIF^{-/-} e selvagem é consistente com os dados de IDO e COX-2 obtidos no presente estudo. Nossos resultados mostraram que animais do tipo selvagem apresentam um perfil mais pró-inflamatório em resposta à infecção com *T. gondii* que animais MIF^{-/-} sendo esta secreção diferencial mais evidente para os resultados de IL-6 e INF γ . Por outro

lado, animais MIF^{-/-} respondem melhor ao perfil Th2 em resposta à gestação, principalmente por induzir a produção de IL-4 e IL-10.

Juntos, estes resultados demonstram que MIF é capaz de mediar uma resposta de perfil Th1 ao inibir a atividade imunossupressora da IDO e conduzir para produção de mediadores pro-inflamatórios tais como COX-2 e citocinas de perfil inflamatório tais como IL-6 e IFN γ . Por outro lado, na ausência de MIF conforme observado nos experimentos com animais MIF^{-/-} ocorre um aumento da expressão de IDO que conduz para uma resposta de perfil preferencialmente antiinflamatório, com redução de mediadores inflamatórios tais como COX-2, redução de citocinas de perfil pró-inflamatório e modulação positiva de citocinas antiinflamatórias. Dados de Murakami e colaboradores (2012) fortalecem a nossa hipótese. Estes autores demonstraram que a inibição da atividade da IDO pode estar envolvida nos mecanismos de controle da infecção por *T. gondii* in vivo sendo que animais IDO^{-/-} apresentaram drástica redução na produção de citocinas inflamatórias frente à infecção por *T. gondii*.

No presente trabalho foi iniciada uma busca pelos mecanismos desencadeados por MIF que seriam capazes de esclarecer quais os papéis desta molécula em atuar como um fator importante para o controle da proliferação de *T. gondii*. Também tentamos esclarecer quais os fatores envolvidos na diferença de regulação destas moléculas em diferentes idades gestacionais. Os resultados apontados por nosso nos geraram alguns esclarecimentos e nos direcionaram novos questionamentos. Novos estudos poderão adicionar mais informações sobre a atividade de MIF em tecidos placentários.

Uma nova abordagem interessante seria a busca por correlação entre MIF e atividade fagocítica em células trofoblásticas. A fagocitose em células trofoblásticas é um processo fisiológico importante em diversas fases da gestação tais como implantação e placentação (MUNTENER, HSU 1977; BEVILACQUA, ABRAHAMSOHN, 1988; KANAI-AZUMA ET AL, 1994). Além disso, a fagocitose mediada por células trofoblásticas desempenha um mecanismo de defesa que contribui para a remoção de agentes infecciosos da interface materno-fetal (PAVIA, 1983; GUILBERT et al 1993; AMARANTE-PAFFARO et al, 2004). A regulação de fagocitose em células trofoblásticas é dependentes da idade gestacional (AMARANTE-PAFFARO, et al., 2004) sendo que os períodos gestacionais em que a

fagocitose ocorre com maior frequência coincidem com as fases de maior expressão de MIF conforme resultados obtidos no presente trabalho. Soma-se a isso o fato de que MIF foi inicialmente descrita como uma citocina capaz ativar macrófagos e mantê-los no local da inflamação.

Portanto, o presente trabalho apresentou um modelo de estudo interessante para a busca de esclarecimentos das diferentes respostas do trofoblasto que ocorrem de forma dependente da idade gestacional. Novas investigações neste campo de pesquisa serão de fundamental importância para a melhor compressão das respostas imunológicas e sinalizações celulares que ocorrem na interface materno-fetal.

6. CONCLUSÃO:

Em conclusão, nós mostramos que MIF foi positivamente regulada em explantes de primeiro trimestre e que esta regulação foi importante para o controle da infecção. Por outro lado, a ausência de regulação positiva após infecção em explantes de terceiro trimestre pode estar relacionada com a maior suscetibilidade à infecção nesta idade gestacional. Embora, haja suporte na literatura de que a atividade de MIF depende da sinalização mediada por MAPk, no presente estudo ficou demonstrado que o controle da infecção de *T. gondii* em explantes placentários mediada por MIF é independente da atividade de ERK1/2, p38 ou JNK. Por outro lado, ficou demonstrado uma provável correlação entre a atividade de MIF e a ativação da IDO como mecanismo de proteção de tecidos placentários contra a infecção por *T. gondii*. Um estudo mais aprofundado a respeito da atividade de MIF no microambiente placentário será um importante passo para esclarecer as respostas do trofoblasto à infecção, particularmente, com relação à transmissão vertical de *T. gondii* durante a gestação.

- Explantes de primeiro trimestre expressam maiores quantidade de receptor para MIF quando comparados aos explantes de terceiro trimestre;
- Explantes de primeiro trimestre aumentam a liberação de MIF frente à infecção por *T. gondii*. Esta regulação positiva não pode ser observada em explantes de terceiro trimestre;
- A localização de MIF em explantes de primeiro trimestre é alterada após a infecção. MIF foi imunolocalizado no citotrofoblasto antes da infecção e no sinciotrofoblasto após a infecção. A localização no sinciotrofoblasto provavelmente coincide com a localização do receptor de MIF. Esta situação não se repete em explantes de terceiro trimestre.
- IFN γ parece ser a principal citocina capaz de induzir a liberação de MIF em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação;
- MIF foi induzida em vez de inibida na presença de infecção associada com estímulos antiinflamatórios em explantes de primeiro trimestre. Este evento não se repete em explantes de terceiro trimestre;
- Explantes de primeiro trimestre foram capazes de controlar o parasitismo frente aos seguintes estímulos: MIF (25 e 100 ng/mL), IFN γ , IL-12 e IL-

10 (10 e 25 ng/mL); Já os explantes de terceiro trimestre conseguiram controlar o parasitismo na maior concentração de MIF (100 ng/mL), além de IL-12 e TGF- β 1 (1ng/mL);

- A atividade de MIF no controle da infecção em células trofoblásticas ocorre de maneira independente da fosforilação de proteínas da família MAPk;
- A função das MAPk no controle da proliferação de *T. gondii* é dependente da idade gestacional;
- A liberação de citocinas antiinflamatórias e reguladoras em resposta à infecção por *T. gondii* ocorre de maneira dependente da idade gestacional;
- Animais C57BL/6 apresentam maior morbidade frente à infecção por *T. gondii* que animais do tipo selvagem;
- A expressão de IDO foi induzida na ausência de MIF, mostrando que o controle da infecção mediado por MIF pode estar associado com a inibição das atividades imunossupressoras da IDO;
- A COX-2 é expressa em menor intensidade em úteros de animais MIF^{-/-} se comparados com controle selvagem;
- Animais MIF^{-/-} apresentam menor resposta de produção de citocinas pró-inflamatórias frente à infecção por *T. gondii* que animais do tipo selvagem.
- Animais MIF^{-/-} apresentam melhor resposta de produção de citocinas de perfil antiinflamatório em resposta à gestação que animais tipo selvagem

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALEXANDER, D.L.; MITAL, J.; WARD, G.E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J.C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathog**, United States, v.1, p1-17, Oct, 2005.

ALIBERT, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nat. Rev. Immunol.**, England, v. 5, n. 2, p. 162–170, Feb. 2005.

ALIBERTI, J., VALENZUELA, J.G., CARRUTHERS, V.B., HIENY, S., ANDERSEN, J., CHAREST, H., REIS E SOUSA, C., FAIRLAMB, A., RIBEIRO, J.M., SHER, A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nat Immun**, United States, v. 4, p. 485–490, May, 2003.

AKIRA, S., TAKEDA, K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. **Comptes Rendus Biologies**, France, v. 327, nº 6, p. 581–589, Jun, 2004.

AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G.S.; CORREA, S.T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, England, v. 128, n. 2, p. 207–218, Aug. 2004.

ARCURI, F.; BUCHWALDER, L.; TOTI, P.; CINTORINO, M.; TOSI, P.; LOCKWOOD, C.J.; RYBALOV, B.; SCHATZ, F. Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface. **Biol Reprod**, United States, v. 76, nº 3, p. 433-439, Mar, 2007.

ARCURI, F.; CINTORINO, M.; VATTI, R.; CARDUCCI, A.; LIBERATORI, S.; PAULESU, L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. **Biol Reprod**, United States, v. 60, nº 6, p. 1299-1303, Jun, 1999.

ARCURI, F.; RICCI, C.; IETTA, F.; CINTORINO, M.; TRIPODI, S.A.; CETIN, I.; GARZIA, E.; SCHATZ, F.; KLEMI, P.; SANTOPIETRO, R.; PAULESU, L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, United States, v. 64, nº 4, p. 1200-1205, Apr, 2001.

APTE, R.S.; APTE, R.S.; SINHA, D.; MAYHEW, E.; WISTOW, G.J.; NIEDERKORN, J.Y. Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. **J Immunol**, United States, v. 160, n. 12, p. 5693-5696, Jun, 1998.

AUGUSTIJN, K. D., et al. Functional characterization of the *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* homologues of macrophage migration inhibitory factor. **Infect. Immun.**, United States, v. 75, n. 3, p. 1116-1128, Mar. 2007.

BABAN, B.; CHANDLER, P.; MCCOOL, D.; MARSHALL, B.; MUNN, D.H.; MELLOR,

A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. **J. Reprod. Immunol.**, v. 61, n. 2, p. 67–77. Apr. 2004.

BANERJEE, S.; et al. Placental expression of interferon-gamma (IFN-gamma) and its receptor IFN-gamma R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, United States, v. 90, n. 2, p. 944–952, Feb. 2005.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J Exp Med**, United States, v. 195, n.12, p. 1625-33, jun. 2002.

BECK, J.R. ; FUNG, C. STRAUB, K.W., COPPENS, I.; VASHISHT, A.A.; WOHLSCHEGEL, J.A., BRADLEY, P.J. A Toxoplasma Palmitoyl Acyl Transferase and the Palmitoylated Armadillo Repeat Protein TgARO Govern Apical Rhoptry Tethering and Reveal a Critical Role for the Rhoptries in Host Cell Invasion but Not Egress. **PLoS Pathog.**, United States, v. 9, n. 2, p. 1-13, Feb. 2013.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. **J Mol Med**, Germany, v. 76, p.151-61, Mar, 1998.

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

BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. **J Morphol**, v. 198, p. 341–351, Dec. 1988.

BIECHE, I.; PARFAIT, B.; LE DOUSSAL, V.; OLIVI, M.; RIO, M.C.; LIDEREAU, R.; VIDAUD, M. Identification of CGA as a novel estrogen receptor–responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. **Cancer Res**, United States, v. 61, n. 4, p. 1652–1658, Feb. 2001.

BLISS, S.K.; BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. Rapid recruitment of neutrophils with prestored IL-12 during microbial infection. **J Immunol**; United States, v. 165, p. 4515 - 21, 2000.

BLISS, S. K.; GAVRILESCU, L. C. ; ALCARAZ, A. ; DENKERS, E. Y. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infect Immun**, United States, v. 69, nº 8, p. 4898-4905, Aug, 2001.

BLOOM, B.R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**, United States, v. 153 (731), p. 80-82, Jul, 1966.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in γ interferon-treated mouse macrophages. **Infect Immun**, United States, v. 61, nº 3, p. 1141-1145, Mar, 1993.

BOGDAN, C.; NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. **Ann NY Acad Scie**, United States, v. 685, p.713-39, Jun, 1993.

BOYD, J.D.; HAMILTON, W.J. **The Human Placenta**. Heffer and Sons: Cambridge, 1970.

BOYER, K.; R. MCLEOD. **Toxoplasmosis**, 1ª edição, v. 286. Churchill Livingstone, New York, N.Y., 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, United States, v. 72, p. 248 – 254, May. 1976.

BROWN, C. R., HUNTER, C. A.; ESTES, R. G.; BECKMANN, E.; FORMAN, J.; DAVID, C.; REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. **Immunol**, England, v. 85, nº 3, p. 419 - 428, Jul, 1995.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int Immunopharmacol**, Netherlands, v. 1, nº 8, p. 1457-1467, Aug, 2001.

BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infect Immun**, United States, v. 70, nº 9, p. 5216–5224, Sep, 2002.

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; JOHNSON, P.F.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B. **J. Immunol.**, United States, v. 167, n. 4, p. 2193–2201, Aug, 2001.

CAI, G.; KASTELEIN, R.; HUNTER, C.A. Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, United States, v. 68, n. 12, p. 6932–6938, Dec. 2000.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; SPIEGEL, L.A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as glucocorticoid-induced counter-regulator of cytokine production. **Nature**, United States, v. 377, nº 6544, p. 68-71, Sep, 1995.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, England, v. 3, n. 10, p. 791-800, Oct. 2003.

CAMPS, M.; NICHOLS, A.; ARKINSTALL, S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. **FASEB J**, United States, v. 14, n. 1, p. 6–16, Jan, 2000.

CANIGGIA, I.; TAYLOR, C.V.; RITCHIE, J.W.; LYE, S.J.; LETARTE, M. Endoglin regulates trophoblasts differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. **Endocrinol**, United States, v. 138, n. 11, p. 4977-88, Nov. 1997.

CAREY, K.L.; DONAHUE, C.G.; WARD, G.E. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, Netherlands, v. 105, p. 25–37, Jan, 2000.

CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, Germany, v. 73, p. 114–123, Jun, 1997.

CASTRO, A.S.; ALVES, C.M.; ANGELONI, M.B.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, England, v. 34, n. 3, p. 240-7, Mar. 2013.

CHSAVANEEYAKORN, S.; MOORE, J.M.; OTHORO, C.; OTIENO, J.; CHAIYAROJ, S.C.; SHI, Y.P.; NAHLEN, B.L.; LAL, A.A.; UDHAYAKUMAR, V. Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **J Inf Dis**, United States, v. 186, n. 9, p. 1371-1375, Nov, 2002.

CHEN, P.; LI, J.; BARNES, J.; KOKKONEN, G.C.; LEE, J.C.; LIU, Y. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **J Immunol**, United States, v. 169, n. 11, p. 6408–6416, Dec. 2002.

COMBE, C.L.; CURIEL, T.J.; MORETTO, M.M.; KHAN, I.A. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. **Infect Immun**, United States, v. 73, n. 8, p. 4913-21. Aug. 2005

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C.P. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. **Parasite Immunol.**, v. 29, n. 12, p. 651-60, Dec. 2007.

COLEMAN, J.W., Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, Netherlands, v. 1, n. 8, p. 1397–1406. Aug. 2001.

COLLAZO, C. M.; YAP, G. S.; SEMPOWSKI, G. D.; LUSBY, K. C.; TESSAROLLO, L.; WOUDE, G. F.; SHER, A. TAYLOR, G. A. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential pathogen-specific roles in resistance to infection. **J Exp Med**, v. 194, nº 2, p. 181-188, Jun, 2001.

DAOUD, G.; AMYOT, M.; RASSART, E.; MASSE, A.; SIMONEAU, L.; LAFOND, J. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. **J Physiol.**, v. 15, n. 566, p. 409-23, Jul. 2005.

DAUBENER, W.; MACKENZIE, C. R. IFN- γ activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanisms. **Adv Exp Med Biol.**, United States, v. 467, p. 517-524, 1999.

DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **PNAS**, United States, v. 56, n° 1, p. 72-77, Jul, 1966.

DELALOYE, J.; DE BRUIN, I.J.; DARLING, K.E.; REYMOND, M.K.; SWEEP, F.C.; ROGER, T.; CALANDRA, T.; CAVASSINI, M. Increased macrophage migration inhibitory factor (MIF) plasma levels in acute HIV-1 infection. **Cytokine**, United States, v. 60, n. 2, p. 338-40, Nov. 2012.

DENKERS, E.Y. Toll-Like Receptor Initiated Host Defense against *Toxoplasma gondii*. **J. Biomed and Biotechnol**, United States, v. 2010, p. 1-7, 2010.

DENKERS, E.Y., BUTCHER, B.A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol.**, England, v. 21, n. 1, p. 35–41. 2005.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A.; DEL RIO, L.; KIM, L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. **Immunol Rev**, Denmark, v. 201, p. 191–205, Oct, 2004.

DENKERS, E.Y.; BUTCHER, B.A.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. **Int.J. Parasitol**, England, v. 34, n. 3, p. 411–421, Mar, 2004.

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

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. **N Engl J Med**, United States, v. 290, n. 20, p. 1110-16, may, 1974.

DIEZ, B.; GALDEANO, A.; NICOLAS. R. Relationship between the production of interferon-alpha/beta and interferon-gamma during acute toxoplasmosis. **Parasitol.**, England, v. 99, pt 1, p. 11-5, Aug, 1989.

DONG, C.; DAVIS, R.J.; FLAVELL., R.A. MAP kinases in the immune response. **Annu. Rev. Immunol.**, United States, v. 20, p. 55, Oct, 2002.

DONG, M.; DING, G.; ZHOU, J.; WANG, H.; ZHAO, Y.; HUANG, H. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules: a proteomic analysis. **Cell Physiol Biochem.**, Switzerland, v. 21, n. (5-6), p. 463-72, Apr. 2008.

DAUN, J.M.; CANNON, J.G. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, United States, p. 279, n° 3, 1043-1049, Sep, 2000.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Vet Parasitol**, Netherlands, v 22, n° 3-4, p. 177-202, Dec, 1986.

DÜRR, S.; KINDLER, V. Implication of indolamine 2,3 dioxygenase in the tolerance toward fetuses, tumors, and allografts. **J Leukoc Biol**. United States, v. 93, May, 2013.

ENGİN, A.B.; DOGRUMAN-A.L.F.; ERCİN, U.; CELEBI, B.; BABUR, C.; BUKAN, N. Oxidative stress and tryptophan degradation pattern of acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Parasitol Res**. Germany, v. 111, n. 4, p.1725-30, Oct, 2012.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; YOU, S.; MCGRATH, B.C.; CAVENER, D.R., et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites downregulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J Immunol**, United States, v. 176, n. 11, p. 6752–6761, Jun, 2006.

FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D.A.O.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **Am J Pathol**, United States, v. 172, n.1, p. 50-58, Jan. 2008.

FERGUSON, D.J. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **Int. J. Parasitol.**, England, v. 34, n. 3, p. 347–360, Mar, 2004.

FLASTER, H.; BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. The Macrophage Migratory Inhibitory Factor-Glucocorticoid Dyad: Regulation of Inflammation and Immunity. **Mol Endocrinol**, United States, v. 21 n. 6, p. 1267-1280, jun. 2007.

FLORES, M., et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J**, United States, v. 22, n. 10, p. 1-11., Oct. 2008.

FOX, H. S.; BOND, B. L.; PARLOW, T. G. Estrogen regulates the IFN- γ promoter. **J Immunol**, United States, v. 146, n° 12, p. 4362 - 4367, Jun, 1991.

FRENCH, A.R.; HOLROYD, E.B.; YANG, L.; KIM, S.; YOKOYAMA, W.M. IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation. **Cytokine**, United States, v. 35, n. 5-6, p. 229–234. Sep. 2006.

FUJIGAKI, S.; TAKEMURA, M.; HAMAKAWA, H.; SEISHIMA, M.; SAITO, K. The mechanism of interferon- γ induced anti *Toxoplasma gondii* by indoleamine 2,3-dioxygenase and/or inducible nitric oxide synthase vary among tissues. **Adv Exp Med Biol.**, United States, v. 527, p. 97-103, 2003.

GAZZINELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, United States, n. 149, p. 175–180, Jul. 1992.

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, United States, v. 153, n. 6, p. 2533–2543, Sep. 1994

GEE, J.; LEE, I.L.; GROSSMAN, H.B.; SABICHI, A.L. Forced COX-2 expression induces PGE(2) and invasion in immortalized urothelial cells. **Urol Oncol**, United States, v. 26, n. 6, p. 641 – 645, Nov-Dec. 2008.

GHOSH, N.; CHAKI, R.; MANDAL, V.; MANDAL, S.C. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. **Pharmacol Rep**, Poland, v. 62, n. 2, p. 233 – 244, Mar-Apr, 2010.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, United States; v. 109, p. 81-96, Apr. 2002.

GAZZINELLI, R.T., et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, United States, v. 153, n. 6, p. 2533–43, Sep. 1994.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, United States, v. 126, n. 1, p. 131- 138, Oct. 1982.

GOLDSZMID, R.S., BAFICA, A., JANKOVIC, D., FENG, C.G., CASPAR, P., WINKLER-PICKETT, R., TRINCHIERI, G., SHER, A., TAP-1 indirectly regulates CD4⁺ T cell priming in *Toxoplasma gondii* infection by controlling NK cell IFN- γ production. **J. Exp. Med.**, United States, v. 204, n. 11, p. 2591–2602. Oct. 2007.

GUILBERT, L.; ROBERTSON, S.A.; WEGMANN, T.G. The trophoblast as an integral component of macrophage-cytokine network. **Immunol Cell Biol**, England, v. 71, p. 49–57, Feb. 1993.

HAKANSSON, S.; CHARRON, A.J.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **EMBO J**, England, v. 20, p. 3132-44, Jun, 2001.

HANSEN, A.M.; BALL, H.J.; MITCHELL, A.J.; MIU, J.; TAKIKAWA, O.; HUNT, N.H. Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. **Int. J. Parasitol.**, England, v. 34, n. 12, p. 1309–1319, Nov. 2004.

HARKER, K.S.; UENO, N.; WANG, T.; BONHOMME, C.; LIU, W.; LODOEN, M.B. *Toxoplasma gondii* modulates the dynamics of human monocyte adhesion to vascular endothelium under fluidic shear stress. **J Leukoc Biol.**, United States; *In press*, Mar. 2013.

HENRY, L.; BEVERLEY, J. K. A. Age and sex differences in the response of lymph node post-capillary venules in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Br J Exp Pathol**, v. 57, n° 3, p. 274–281, Jun, 1976.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, Canada, v. 8, n. 10, p.634–640, Oct. 2002.

HOFF, E.F.; CARRUTHERS, V.B. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? **Trends Parasitol**, England, v. 18, p. 251-5, Jun, 2002.

HOU, B.; BENSON, A.; KUZMICH, L.; deFRANCO, A.L.; YAROVINSKY, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, United States, v.108, n. 1, p. 278–283, Jan. 2011.

HUCK, B.; STECK, T.; HABERSACK, M.; DIETL, J.; KAMMERER, U. Pregnancy associated hormones modulate the cytokine production but not the phenotype of PBMC-derived human dendritic cells. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Ireland, v.122, p. 85, 2005.

HUDSON, J.D. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **J Exp Med**, United States, v. 190, n° 10, p. 1367-70, Nov, 1999.

HUGHES, G.C.; CLARK, E.A.; WONG, A.H. The intracellular progesterone receptor regulates CD4+ T cells and T cell-dependent antibody responses. **J Leukoc Biol.**; v. 93, n. 3, p. 369-75, Mar. 2013.

HUNTER, C.A.; SUBAUSTE, C.S.; VAN CLEAVE, V.H.; REMINGTON, J.S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect Immun**, United States, v. 62, p. 2818–24, Oct, 1994.

HUNTER, C.A., et al. The role of the CD28/B7 interaction in regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, United States, v. 158, n. 5, p. 2285–93, Mar. 1997.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.** United States, v. 5, n. 10, p. 987–995. Oct. 2004.

JANG, S.I.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S.H.; KIM, D.K.; PAGES, M.; HONG, Y.H.; MIN, W.; LILLEHOJ, E.P. Distinct immunoregulatory properties of macrophage migration inhibitory factors encoded by *Eimeria* parasites and their chicken host. **Vaccine**, Netherlands, v. 29, n. 48, p. 8998-9004, Nov, 2011.

JONES, T. C.; BIENZ, K. A.; ERB, P. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of γ interferon. **Infect Immun**, United States, v. 51, n. 1, p. 147-156, Jan, 1986.

JUTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; ROLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Macrophage migration inhibitory factor induced killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . **J Immunol**, United States, v. 161, n. 5, p. 2383-90. Sep. 1998.

KAFSACK, B.F.; PENA, J.D.; COPPENS, I.; RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J.C.; CARRUTHERS, V.B. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. **Science**, United States, v. 323, p. 530-3, Jan. 2009.

KAMIR, D., et al. A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. **J. Immunol.**, United States, v. 180, n. 12, p. 8250-8261, Jun, 2008.

KASPER, L. H.; BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitol Today**, England, v.14, n° 4, p.150-156, Apr, 1998.

KANAI-AZUMA, M.; KANAI, Y.; KUROHMARU, M.; TACHI, C.; YAZAKI, K.; HAYASHI, Y. Giant cell transformation of trophoblast cells in mice. **Endocrine Journal**, v. 41(Suppl), p. 33–41, 1994.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**, England, v. 17, p. 338–344, 2005.

KHAN, I.A.; THOMAS, S.Y.; MORETTO, M.M.; LEE, F.S.; ISLAM, S.A.; COMBE, C.; SCHWARTZMAN, J.D.; LUSTER, A.D. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS Pathog.**, v 2, n. 6, p. 484 - 500, Jun, 2006.

KIM, L., BUTCHER, B.A., DENKERS, E.Y., *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. **J. Immunol.**, United States, v. 172, n. 5, p. 3003–3010. Mar. 2004.

KIM, L.; BUTCHER, B. A.; LEE, C. W.; UEMATSU, S.; AKIRA S.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88- dependent signaling in infected macrophages. **J Immunol**, United States, v. 177, n. 4, p. 2584–91, Aug. 2006.

KITTAS, C.; HENRY, L. Effect of sex hormones on the response of mice to infection with *Toxoplasma gondii*. **Br J Exp Pathol**, England, v. 61, n° 6, p. 590–600, Dec, 1980.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. Macrophage Migration Inhibitory Factor is Expressed by Equine Conceptuses and Endometrium. **Reprod Domest Anim.**, Germany, v .48, n. 2, p. 297-304, Apr. 2013

KOBAYASHI, T.; WALSH, P. T.; WALSH, M. C.; SPEIRS, K. M.; CHIFFOLEAU, E. KING, C. G.; HANCOCK, W. W. CAAMANO, J. H.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P.; TURKA, L. A.; CHOI, Y. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. **Immunity**, United States, v. 19, n° 3, p. 353-369, Set, 2003.

KOEBERNICK, H.; GRODE, L.; DAVID, J.R.; ROHDE, W.; ROLPH, M.S.; MITTRÜCKER, H-W.; KAUFMANN, S.H.E. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. **PNAS**, United States, v. 99, n. 21, p. 13681-86, Oct. 2002.

KOTLYAROV, A., et al. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. **Nat Cell Biol**; England, v. 1, n. 2, p. 94–97, Jun. 1999.

KUDRIN, A.; RAY, D. Cunning factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target. **Immunol. Cell Biol.**, n. 3, v. 86, p. 232-238, Mar-Apr. 2008.

KYRIAKIS, J.M. Thinking outside the box about Ras. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 17, p. 10993– 10994, Apr, 2009.

KUDO, Y.; BOYD, C.A. Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. **Biochim. Biophys. Acta**, Netherlands, v. 1500, n. 1, p. 119–124, Jan. 2000.

LACHENMAIER, S.M.; DELI, M.A.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **J Neuroimmunol.**; Netherlands, v. 232, n. (1-2), p. 119-30, Mar. 2011.

LANG, C.; GROB, U.; CARSTEN, G. K. L. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, Germany, v. 100, n° 2, p. 191-203, Jan, 2007.

LARSON, D.F.; HORAK, K. Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation. **Crit. Care**, England, v. 10, n. 2, p. 138-140, Apr. 2006.

LERICHE, M.A., DUBREMETZ, J.F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. **Parasitol Res.**, Germany, v. 76, n. 7, p. 359–362, 1990.

LEBRUN, M.; MICHELIN, A.; EL HAJJ, H.; PONCET, J.; BRADLEY, P.J.; VIAL, H.; et al. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. **Cell Microbiol**, England, v. 7, p. 1823-33, Dec, 2005.

LENG, L.; BUCALA, R. Insight into the biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. **Cell Res**, China, v. 16, n° 2, p.162-168, Feb, 2003.

LIESENFELD, O. KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon- γ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Expe Med**, United States, v. 184, n. 2, p. 597–607, Aug. 1996.

LIU, C. H.; DRAN, Y. T.; DIAS, A.; ESPER, L.; CORN, R. A.; BAFICA, A.; MACHADO, F. S.; ALIBERT, J. Cutting Edge: dendritic cells are essential for in vivo

IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J Immunol**, United States, v. 151, n° 1, p. 31-35, Jul, 2006.

LOKE, Y.W. Transmission of parasites across the placenta. **Adv Parasitol**, England, n. 21, p. 155-228, 1982.

LUE, H.; DEWOR, M.; LENG, L.; BUCALA, R.; BERNHAGEN, J. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. **Cell Signal**, England, v. 23, n. 1, p. 135-44. Jan, 2011.

LYNFIELD, R.; GUERINA, N.G. Toxoplasmosis. **Pediatr Rev**, United States, v. 18, p. 75-83, Mar, 1997.

MACKLER, A.M.; BARBER, E.M.; TAKIKAWA, O.; POLLARD, J.W. Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, United States, v. 170, n. 2, p. 823–830, Jan. 2003.

MAI, K.; SHARMAN, P.A.; WALKER, R.A. et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Brazil, v. 104, n. 2, p. 281-9, Mar. 2009.

MARTINEY, J. A.; SHERRY, B.; METZ, C.N.; ESPINOZA, M.; FERRER, A.S.; CALANDRA, T.; BROXMEYER, H.E; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi* -infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. **Infect Immun**, United States, v. 68, n. 4, p. 2259-67, Apr, 2000.

MASEK, K.S.; FIORE, J.; LEITGES, M.; YAN, S.F.; FREEDMAN, B.D.; HUNTER, C.A. Host cell Ca²⁺ and protein kinase C regulate innate recognition of *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, England, v. 119, v. 21, p. 4565-73, Nov. 2002.

MASON, N.J.; FIORE, J.; KOBAYASHI, T.; MASEK, K.S.; CHOI, Y.; HUNTER, C.A. TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, United States, v. 72, n. 10, p. 5662–5667, Oct. 2004

MENNECHET, F. J. KASPER, L. H.; RACHINEL, N.; LI, W.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Lamina propria CD4⁺ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. **J Immunol**, United States, v. 168, p. 2988-2996, 2002.

MERCIER, C., DUBREMETZ, J.F., RAUSCHER, B., LECORDIER, L., SIBLEY, L.D., CESBRON-DELAUW, M.F. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. **Mol Biol Cell**, United States, v. 13, p. 2397–2409, Jul, 2002.

MILLER, R.K.; GENBACEV, O.; TURNER, M.A.; APLIN, J.D.; CANIGGIA, I.; HUPPERTZ, B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. **Placenta**, England, v. 26, n. 6, p. 439-48, Jul. 2005.

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

MILLER, L.; HUNT, J. S. Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone. **J Immunol**, United States, v. 160, nº 10, p. 5098 – 5104, May, 1998.

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

MITCHELL, R.A.; METZ, C.N.; PENG, T.; BUCALA, R. Sustained Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmatic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). **J Biol Chem**, United States, v, 274, n. 25, p. 18100-06, jun. 1999.

MIYAURA, H.; IWATA, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **J Immunol**, United States, v. 168, nº 3, p. 1087-1094, Feb, 2002.

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

MOON, K.C.; PARK, J.S.; NORWITZ, E.R.; KIM, D.I.; OH, K.J.; PARK, C.W.; JUN, J.K.; SYN, H.C. Expression of extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the invasivetrophoblasts at the human placental bed. **Placenta**, England, v. 29, n. 5, p. 391-5, May. 2008.

MUNN, D.H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J.T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J. Exp. Med.**, United States, v. 189, n. 9, p. 1363–1372. May. 1999.

MUNN, D.H.; SHARMA, M.D.; BABAN, B.; HARDING, H.P.; ZHANG, Y.; RON, D.; MELLOR, A.L. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. **Immunity**, United States, v. 22, n. 5, p. 633–642, May. 2005.

MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J.T.; et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, United States, v. 281, n. 21, p. 1122–1124. Aug. 1998.

MUNTENER, M.; HSU, Y.C. Development of trophoblast and placenta in the mouse. **Acta Anatomica**, Switzerland, v. 98, n. 3, p. 241–252, 1977.

MURAKAMI, Y.; HOSHI, M.; HARA, A.; TAKEMURA, M.; ARIOKA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MATSUNAMI, H.; FUNATO, T.; SEISHIMA, M.; SAITO, K. Inhibition of increase indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. **Cytokine**, United States, v. 59, n. 2, p. 245-51, Aug, 2012.

NAGINENI, C.N.; PARDHASARADHI, K. MARTINS, M. C.; DETRICK, B.; HOOKS, J. J. Mechanisms of interferon-induced inhibition *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. **Infect Immun**, United States, v. 64, n° 10, p. 4188-4196, Oct, 1996.

NAKAAR, V., NGO, H. M., AARONSON, E. P., COPPENS, I., STEDMAN, T. T., AND JOINER, K. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, England, v. 116, p. 2311–2320, Jun, 2003.

NEUDECK, A., STACHELHAUS, S., NISCHIK, N., STRIEPEN, B., REICHMANN, G., AND FISCHER, H. G. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. **Microbes Infect**, France, v. 4, p. 581–590, May, 2002.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, England, v. 39, n. 12, p. 1385-94, oct. 2009.

PAVIA, C.S. Expression of the cell-mediated antimicrobial immunity by mouse trophoblast monolayers. **J. Infect. Dis.**, United States, v. 147, n. 6, p. 1006-1010, Jun. 1983.

PFAFF, A.W.; ABOU-BACAR, A.; LATSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, A. MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN- γ . **Parasitol**, England, v. 134, p.1895-1902, Oct, 2007.

PFAFF, A.W.; MOUSLI, M.; SÉNÉGAS, A.; MARCELLIN, L.; TAKIKAWA, O.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. Impact of foetus and mother on IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase expression in murine placenta following *Toxoplasma gondii* infection. **Int J Parasitol**. England, v. 38, n. 2, p. 249-58. Feb. 2008.

PFAFF, A.W.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric production and polyamine biosynthesis. **Int J Parasitol**, England, v. 35, p. 1569-76, Aug, 2005.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **PNAS**, United States, v. 81, n° 3, p. 908-912, Feb, 1984.

POLLARD, A.M.; KNOLL, L.J.; MORDUE, D.G. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. **Trends Parasitol**, England, v. 25, p. 491-4, Nov, 2009.

RANELLA, A.; VASSILIADIS, S.; MASTORA, C.; VALENTINA, M.; DIONYSOPOULOU, E.; ATHANASSAKIS, I. Constitutive Intracellular Expression Of Human Leukocyte Antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. **Hum Immunol**, United States, v. 66, n. 1, p. 43-55, jan. 2005.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within Th1/Th2/Th3 paradigm. **Semin Immunol**, England, v. 13, nº 4, p. 219-227, Aug, 2001.

RAETZ, M.; HWANG, S.H.; WILHELM, C.L., et al., Parasite induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ dependent elimination of Paneth cells. **Nat Immunol**. United States, v.14, n. 2, p. 136-42, Feb. 2013.

REIS E SOUSA, C., et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40Independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. **J Exp Med**, United States, v. 186, n. 11, p. 1819-29, Dec. 1997.

REYES, J.L.; TERRAZAS, L.I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMEZ-GARCÍA, L.; SNIDER, H.; SATOSKAR, A.R.; RODRÍGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 74, n. 6, p. 3170-79, jun. 2006.

RICHARDSON, J.M.; MORRISON, L.S.; BLAND, N.D.; BRUCE, S.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C.; WALKINSHAW, M.D. Structures of *Leishmania* major orthologues of macrophage migration inhibitory factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 380, n. 3, p. 442-448, Mar. 2009.

ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L. D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **J. Immunol**, United States, v. 172, n. 6, p. 3686–94, Mar, 2004.

ROBERT-GANGNEUX F, DARDÉ ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Apr. 2012.

ROBERTS, C. W.; SATOSKAR, A.; ALEXANDER, J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. **Parasitol Today**, England, v. 12, n. 10, p. 382 – 388, Oct, 1996.

ROBERTS, C.W. WALKER, W., ALEXANDER, J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clin Microbiol Rev**, United States, v. 14, n. 3, p. 476-488, Jul, 2001.

ROOS DS, ET AL. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. **Curr. Opin. Microbiol.**, England, v.2, n.4, p. 426–432, Aug. 1999.

ROPERT, C.; CLOSEL, M.; CHAVES, A.C.L.; GAZZINELLI, R.T. Inhibition of a p38/stress-activated protein kinase-2-dependent phosphatase restores function of IL-1 receptor-associated kinase-1 and reverses Toll-like receptor 2- and 4-dependent

tolerance in macrophages. **J Immunol**, United States, v. 171, n. 3, p. 1456–1465, Aug, 2003.

RUBIN, B.Y.; ANDERSON, S.L.; XING, L.; POWELL, R.J.; TATE, W.P. Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, United States, v. 266, n. 36, p. 24245–24248, Dec. 1991.

SANECKA, A.; FRICKEL, E.M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, United States, v.3, n.7, p. 678–689, Nov. 2012.

SAEIJ, J.P.J.; COLLIER, S.; BOYLE, J.P.; JEROME, M.E.; WHITE, M.W.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue, **Nature**, England, v. 445, n. 7125, p. 324–327, Jan. 2007.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D. et al., Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J Immunol**, United States, v. 168, n. 12, p. 5997–6001, Jun. 2002.

SCHMIDT, S.K.; SIEPMANN, S.; KUHLMANN, K.; MEYER, H.E.; METZGER, S.; PUDELKO, S.; LEINWEBER, M.; DAUBENER, W. Influence of Tryptophan Contained in 1-Methyl-Tryptophan on Antimicrobial and Immunoregulatory Functions of Indoleamine 2,3-Dioxygenase, **PLoS ONE**, United States, v. 7, n. 9, p. 44797, Sep. 2012.

SINAI, A., WEBSTER, J.P., JOINER, K.A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. **J Cell Sci**, England, v. 110, p. 2117–2128, Sep, 1997.

SHAPIRA, S.; SPEIRS, K.; GERSTEIN, A.; CAAMANO, J.; HUNTER, C.A. Suppression of NF- κ B activation by infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, United States, v. 185, Suppl.1, p. S66–S72. Feb. 2002.

SHI X, LENG L, WANG T, WANG W, DU X, LI J, MCDONALD C, CHEN Z, MURPHY JW, LOLIS E, NOBLE P, KNUDSON W, BUCALA R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. **Immunity**, United States, v. 25, n. 4, p. 595-606, Oct. 2006.

SOMMERVILLE, C.; RICHARDSON, J.M.; WILLIAMS, R.A.; MOTTRAM, J.C.; ROBERTS, C.W.; ALEXANDER, J.; HENRIQUEZ, F.L. Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **J Biol Chem.**, United States, Feb. 2013, in press.

STAFFORD, J. J.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit Rev Microbiol**, England, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002.

STOJANOVIC, I.; MIRKOV, I.; KATARANOVSKI, M.; GLAMOCLIIJA, J.; STOSIC-GRUJICIC, S. A role for macrophage migration inhibitory factor in protective immunity against *Aspergillus fumigatus*. **Immunobiology**, Netherlands, v. 216, n. 9, p. 1018-27, Sep. 2011.

STRAW, A.D.; MacDONALD, A.S.; DENKERS, E.Y.; PEARCE, E.J. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. **J Immunol**, United States, v. 170, n. 2, p. 727–734, Jan. 2003.

SUGUITAN, A. L. JR; SUGUITAN, A.L. JR; LEKE, R.G.; FOU DA, G.; ZHOU, A.; THUITA, L.; METENOU, S.; FOGAKO, J.; MEGNEKOU, R.; TAYLOR, D.W.; Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, United States, v. 88, p. 1074-82, Jul, 2003.

SUKHUMAVASI, W.; EGAN, C. E.; DENKERS, E.Y. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. **J Immunol**, United States, v. 179, n° 6, p. 3570–3577, Sep, 2007.

SUZUE, K.; ASAI, T.; TAKEUCHI, T.; KOYASU, S. In vivo role of IFN- γ by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur. J. Immunol.**, Germany, v. 33, n. 10, p. 2666–2675, Oct, 2003.

SUZUKI H, KANAGAWA H, NISHIHARA J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos, **Immunology Letters**, Netherlands, v. 51, n° 3, p. 141-147, Jul, 1996.

SWANTEK, J.L.; COBB, M.H.; GEPPERT, T.D. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. **Mol. Cell. Biol.**, United States, v. 17, n. 11, p. 6274–6282. Nov. 1997.

TAKÁCS, A.C.; SWIERZY, I.J.; LÜDER, C.G. Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. **PLoS One.**, United States, v. 7, n. 9, Sep. 2012.

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

TEO, F.C.; ZHOU, X.W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V.B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* micronime secretion and cell invasion. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v. 51, n.2, p. 679-688, Feb. 2007.

TERRAZAS, C.A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L.I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E.A.; ROCRIGUES-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: Impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Exp Parasitol**, United States, v, 126, n. 3, p. 348-58, Nov. 2010.

TOMLEY, F.M.; SOLDATI, D.S. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. **Trends parasitol**, England, v. 17, p. 81–88, Feb, 2001.

TORRES, M.; GUITON, R.; LACROIX-LAMANDÉ, S.; RYFFEL, B.; LEMAN, S.; DIMIER-POISSON, I. MyD88 is crucial for the development of a protective CNS immune response to *Toxoplasma gondii* infection. **J Neuroinflammation**., England, v. 10, n. 19, p. 1-12, Feb, 2013.

TSE, W.T.; PENDLETON, J.D.; BEYER, W.M.; EGALKA, M.C.; GUINAN, E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v. 75, n. 3, p. 389 - 397. Feb, 2003.

VALÈRE, A., GARNOTEL, R., VILLENA, I., GUENOUNOU, M., PINON, J.M., AUBERT, D. Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. **Parasite**, France, v. 10, n. 1, p. 59–64. Mar, 2003.

vanGISBERGEN, K. P.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. **Trends Immunol**, England, v. 26, n° 12, p. 626–631, Dec, 2005.

vonBERNUTH, H.C.; PICARD, Z.; JIN, et al., Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency, **Science**, United States, v. 321, n. 5889, p. 691–696, Aug, 2008.

XU, L.; LI, Y.; SUN, H.; ZHEN, X.; QIAO, C.; TIAN, S.; HOU, T. Current developments of macrophage migration inhibitory factors (MIF) inhibitors. **Drug Discov Today**, England, Mar. 2013. *In press*.

ZANG, X., TAYLOR, P.; WANG, J.M., et al. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. **J. Biol. Chem.**, United States, v. 277, n. 46, p. 44261-44267, Nov, 2002.

WADA, S., FUJIMOTO, S.; MIZUE, Y.; NISHIHARA, J. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the human ovary: presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. **Biochem Mol Biol Int**, England, v. 41, n. 4, p. 805-814, Apr, 1997.

WANG, Y-C.; HUANG, K-M. In vitro anti-inflammatory effect of apigenin in the *Helicobacter pylori*-infected gastric adenocarcinoma cells. **Food Chem Toxicol.**, England., v. 53, p. 376-83, Mar. 2013.

WEISER, W.Y. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. **PNAS**, United States, v. 86, n° 19, p.7522-61989, Oct, 1989.

WYSK, M.; YANG, D.D.; LU, H.T.; FLAVELL, R.T.; DAVIS R.J. Requirement for mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced

cytokine expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, United States, v. 96, n. 7, p. 3763-8. Mar. 1999

YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology**; Netherlands, v. 201, n. 2, p. 240-7, Dec. 1999.

8. ANEXOS:

8.1. ANEXO I



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

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

ANÁLISE FINAL Nº. 055/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
006/09

Projeto Pesquisa: Papel do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na ativação de cascatas de sinalização intracelular em trofoblasto submetido à infecção por toxoplasma gondii.

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

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

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

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório parcial: Dezembro de 2009.

Data para entrega de relatório parcial: Dezembro de 2010.

Data para entrega de relatório parcial: Dezembro de 2011.

Data para entrega de relatório final: Dezembro de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 20 de março de 2009.

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

Orientações ao pesquisador

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

8.2. ANEXO II



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131/4335; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 032/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O
PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 002/09

Projeto Pesquisa: **"Papel do Fator de Inibição de Macrófagos (MIF) na ativação de cascatas de sinalização intracelular em trofoblasto submetido à infecção por Toxoplasma Gondii"**.

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO COM RECOMENDAÇÕES.

PEDE-SE QUE O PROTOCOLO SEJA SUBMETIDO À CIBIO (COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA) ANTES DO PROJETO SER INICIADO.

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

Uberlândia, 27 de abril de 2009.

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenadora do CEUA/UFU

9. FIGURAS

Figura 1: **A:** Dados de PCR em tempo real para o receptor de MIF (CD74) usando RNA de explantes de placenta humana infectados com *T. gondii*. Conteúdos de cDNA foram normalizados com base nos níveis de β -actina. Os valores médios obtidos de explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação foram comparados usando o teste *t* de Student (**P* = 0,001). **B e C:** Imunolocalização de CD74 em explantes de placenta de primeiro trimestre (**B**) e explantes de terceiro trimestre (**C**) infectados por *T. gondii*. A expressão de CD74 foi identificada pela marcação com imunofosfatase e contracoloração com hematoxilina de Mayer. A marcação para o receptor de MIF está ilustrada por asteriscos (*) nas células trofoblásticas e por setas (→) nas células mesenquimais.

FIGURA 1

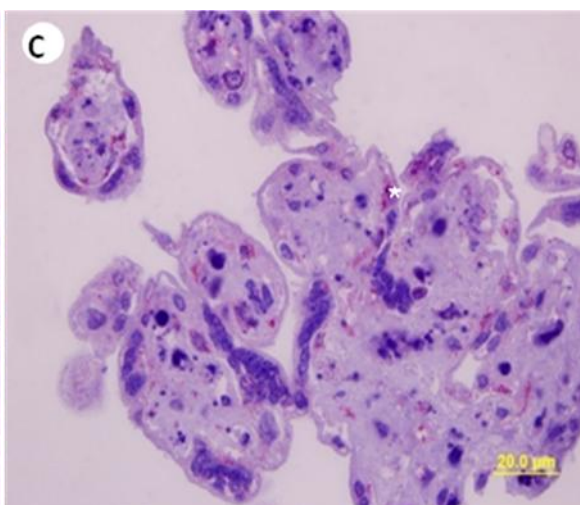
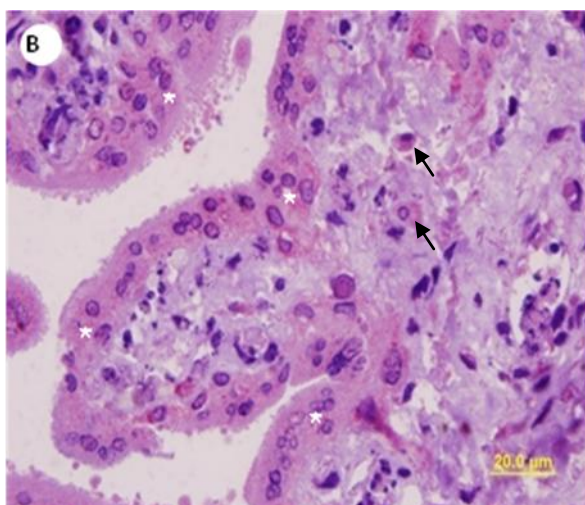
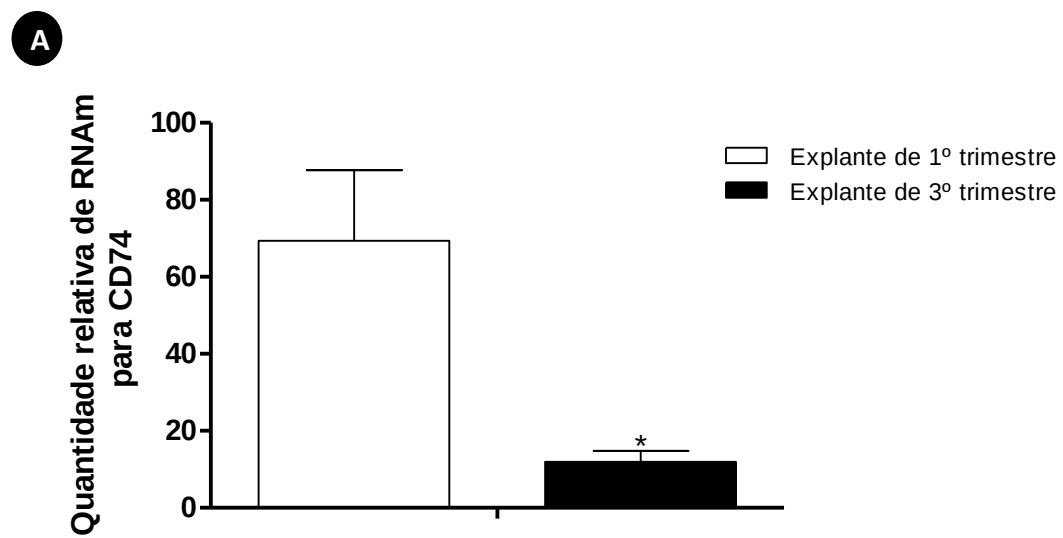


Figura 2: A: liberação de MIF em explantes de placenta humana após tratamento com diversos estímulos. Explantes de primeiro e terceiro trimestre foram tratados com IL-12 (25ng/mL), IFN γ (25ng/mL), IL-10 (10 e 25ng/mL), TGF- β 1 (1 e 10ng/mL) ou meio de cultura. Os explantes foram infectados ou não com *T. gondii* e foram novamente estimulados. Os sobrenadantes foram coletados após 24 horas e MIF foi mensurado usando o ensaio ELISA. Dados estão apresentados como média de três experimentos independentes realizados em triplicata (n=9). Os valores médios obtidos para diferentes estímulos e infecção de explantes de primeiro e terceiro trimestre foram comparados com seus respectivos controles (não infectados e não estimulados) pelo teste de variância one way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados para as comparações estão representados por símbolos: primeiro trimestre ($\dagger P = 0,01$ e $\dagger\dagger P = 0,001$); e terceiro trimestre ($\ddagger P = 0,01$). Comparações entre idades estão indicadas por barras. Os valores médios obtidos para explantes de primeiro e terceiro trimestre foram comparados usando o teste *t* de Student ($*P = 0,05$ e $**P = 0,01$). **B-E:** Imunolocalização de MIF em explantes de placenta humana. **B:** explantes de primeiro trimestre controle (não tratados e não infectados). **C:** explantes de primeiro trimestre (não tratados e infectados com taquizoítas de *T. gondii*). **D:** explantes de terceiro trimestre controle (não tratados e não infectados). **E:** explantes de terceiro trimestre (não tratados e infectados com taquizoítas de *T. gondii*). A expressão de MIF foi identificada pela imunofosfatase e contracorado com hematoxilina de Mayer. Os asteriscos (*) indicam marcação intracelular de MIF.

FIGURA 2:

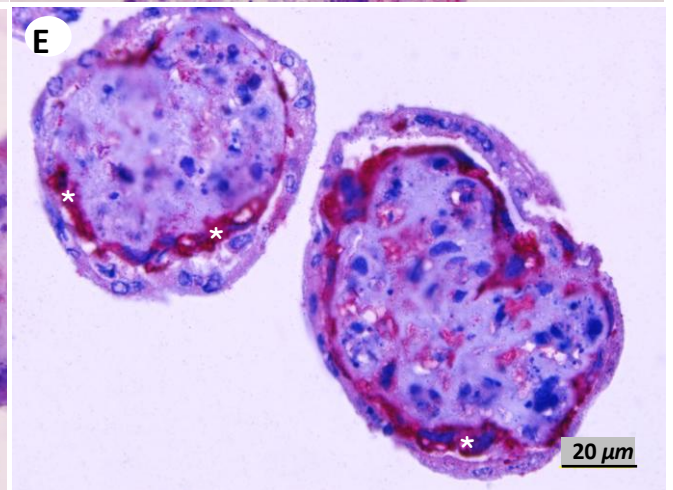
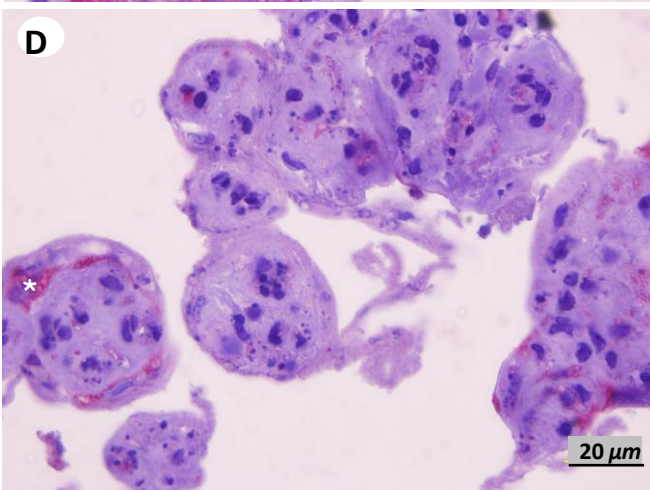
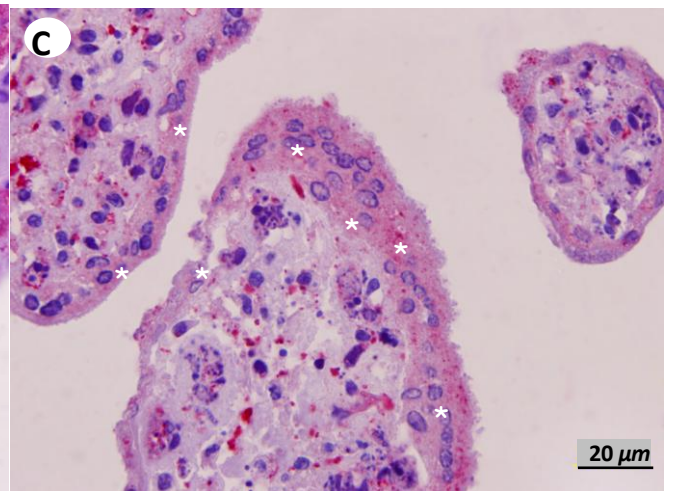
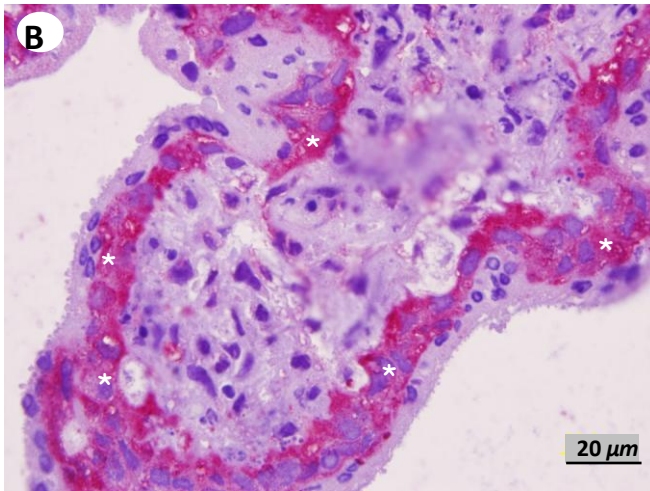
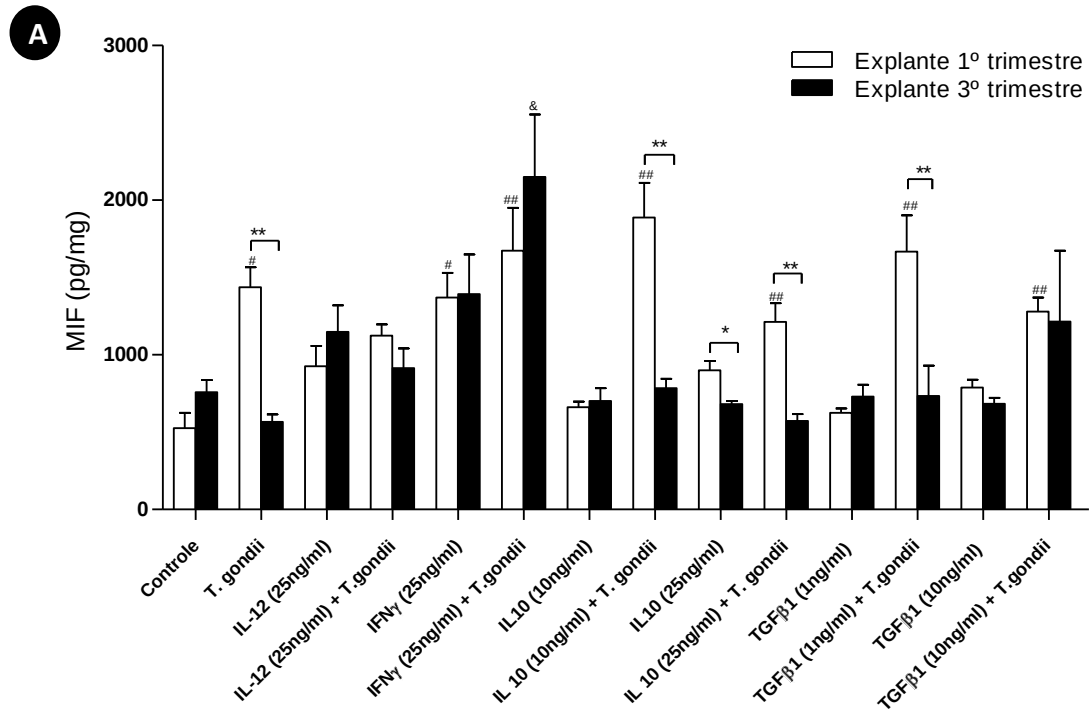


Figura 3: Efeito de vários estímulos sobre a carga parasitária de *T. gondii* em explantes de placenta humana de primeiro e terceiro trimestre de gestação. Os explantes foram tratados com MIF (5, 25 ou 100 ng/mL), IFN γ (25 ng/mL), IL-12 (25ng/mL), IL-10 (10 e 25ng/mL), TGF β -1 (1 e 10 ng/mL) ou meio de cultura. Os explantes foram infectados com *T. gondii* por 24 horas e estimulados novamente por mais 24 horas. Culturas controle foram realizadas somente com meio de cultura. Os explantes placentários foram coletados e os parasitos foram quantificados por PCR em tempo real. Os valores médios obtidos para diferentes estímulos e infecção nos explantes de primeiro e terceiro trimestre foram comparados com seus respectivos controles (não infectados e não estimulados) pela análise de variância *One way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. As diferentes comparações estão representadas por símbolos: primeiro trimestre (#*P* = 0,05; ##*P* = 0,01 e ### *P* = 0,001); terceiro trimestre (&*P* = 0,01 e && *P* = 0,001). Os valores médios obtidos para explantes de primeiro e terceiro trimestre foram comparados usando o teste *t* de Student (**P*=0,05).

FIGURA 3:

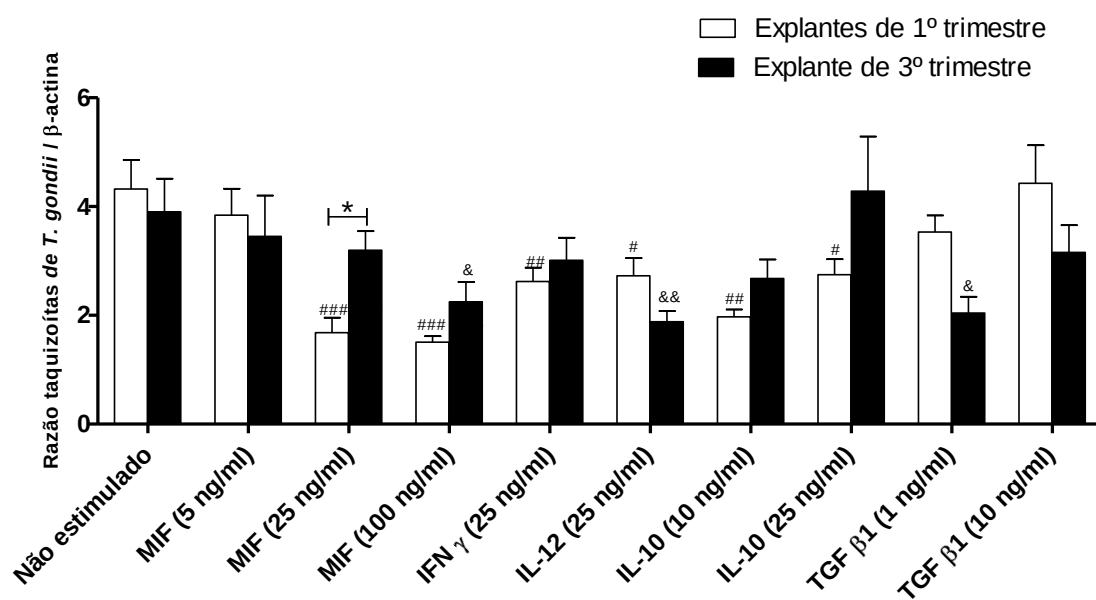


Figura 4: comparações entre liberação de MIF e carga parasitária (*T. gondii*) mediante estímulo com diversas citocinas. A liberação de MIF e a carga parasitária em explantes de placenta humana infectados e estimulados foram comparados com os controles (não estimulados) pelo teste de variância One Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. As comparações estão representadas por símbolos: parasitismo ($\#P = 0,05$; $\#\#P = 0,01$ e $\#\#\#P = 0.001$) e liberação de MIF ($*P = 0,05$). **A)** Experimentos realizações em explantes de primeiro trimestre de gestação. **B)** Experimentos realizações em explantes de terceiro trimestre de gestação.

FIGURA 4:

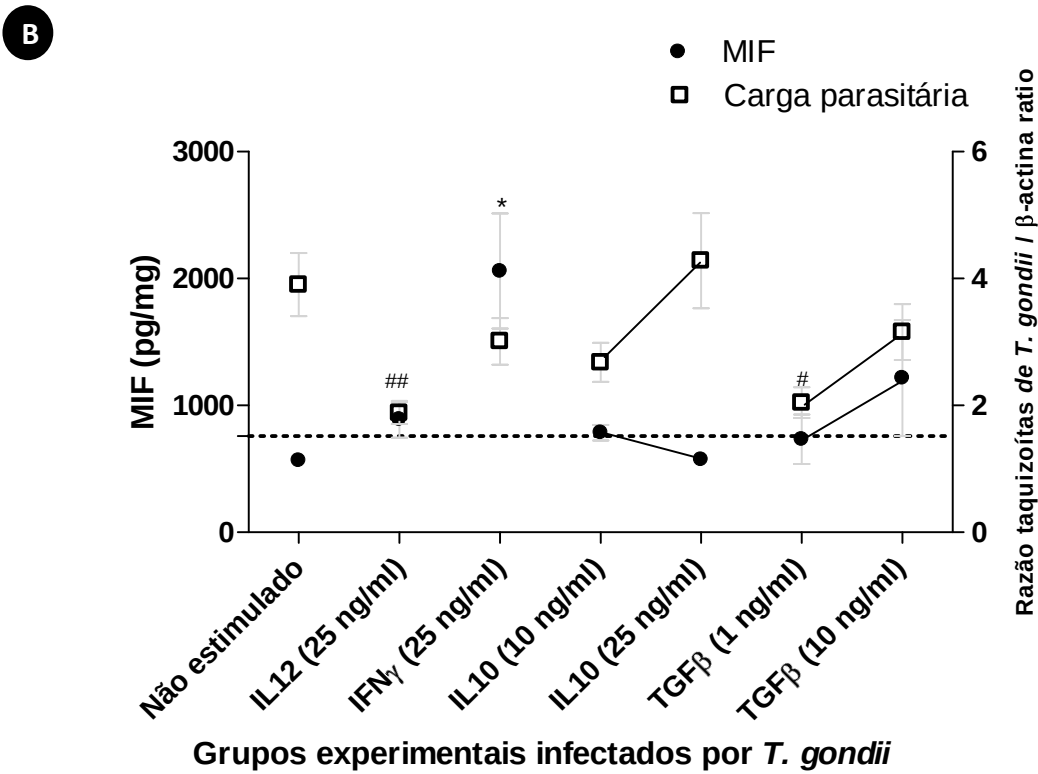
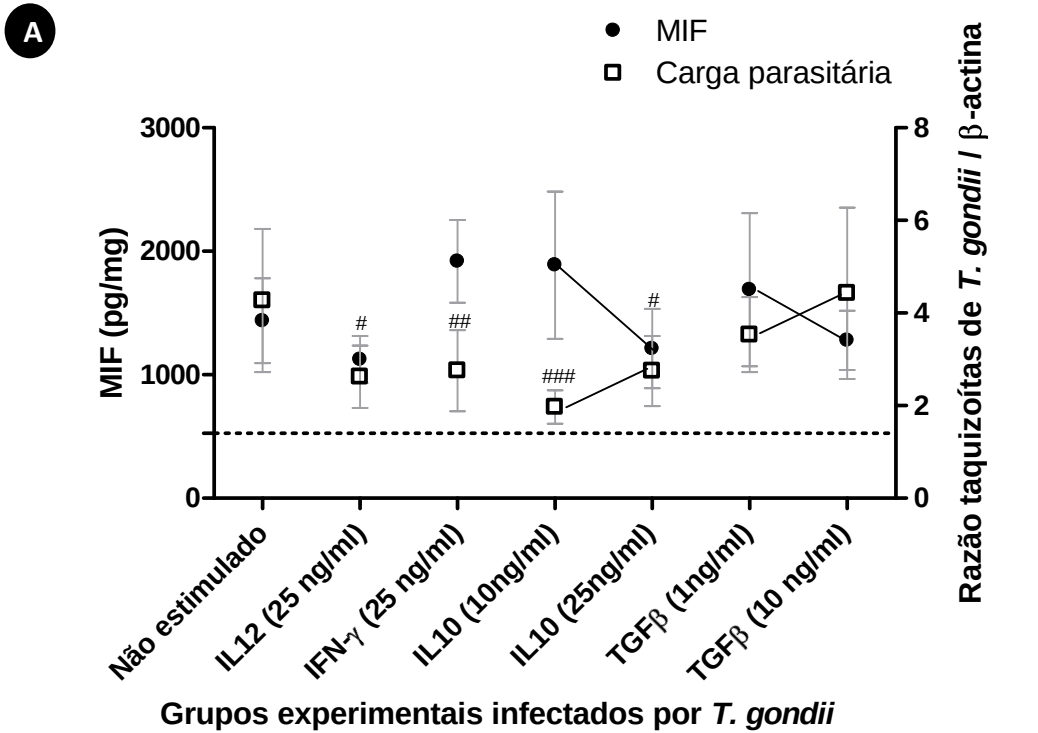


Figura 5. A: Quantificação de taquizoítas de *T. gondii* em explantes de placenta humana de primeiro e terceiro trimestre de gestação por IMQ. O parasitismo foi mensurado em 10 campos microscópicos e três áreas teciduais foram definidas para a localização dos parasitos: parasitos aderidos à superfície de células trofoblásticas, parasitos dentro de células trofoblásticas e parasitos dentro da região de mesênquima. O número total de parasitos por tecido também foi determinado. Os dados foram representados como média de dois experimentos independentes realizados em triplicata (n=6). Comparações entre as diferentes idades gestacionais estão indicadas por barras. Valores médios obtidos para explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação foram comparados usando o teste *t* de Student (**P* < 0,05 e ** *P* < 0,01). **B e C:** Imunolocalização de taquizoítas de *T. gondii* em explantes placentários. *T. gondii* foram identificados por marcação com imunofosfatase e contracordados com hematoxilina de Mayer. **B:** explantes de primeiro trimestre. **C:** explantes de terceiro trimestre. As setas (→) indicam parasitos aderidos na superfície do trofoblasto nos explantes de primeiro trimestre no mesênquima nos explantes de terceiro trimestre.

FIGURA 5:

A

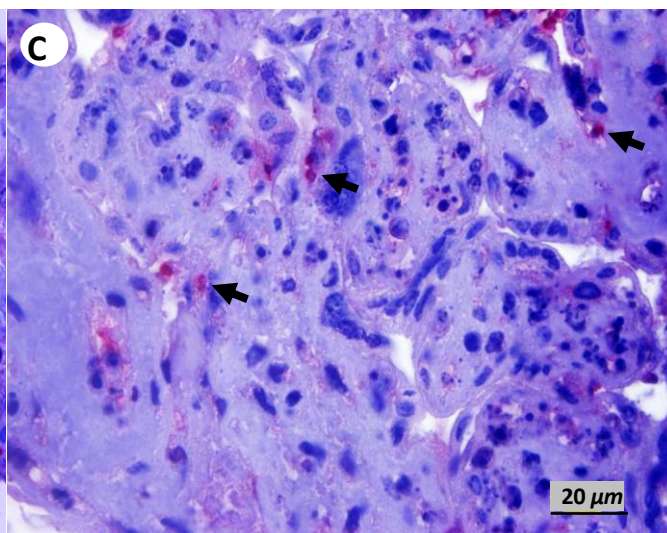
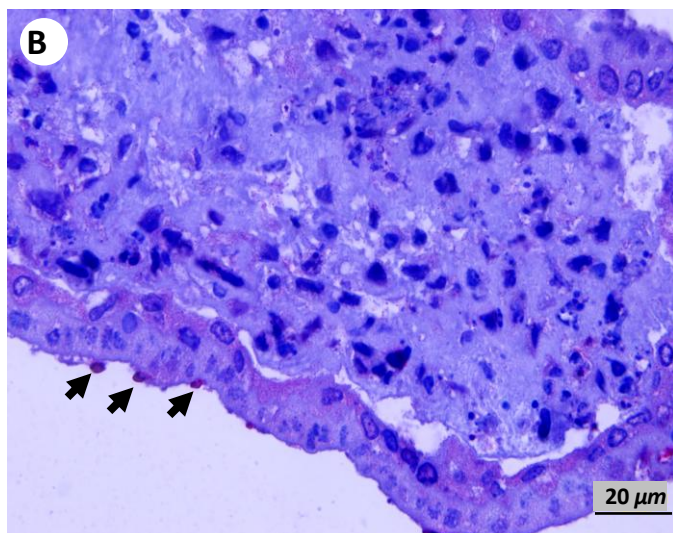
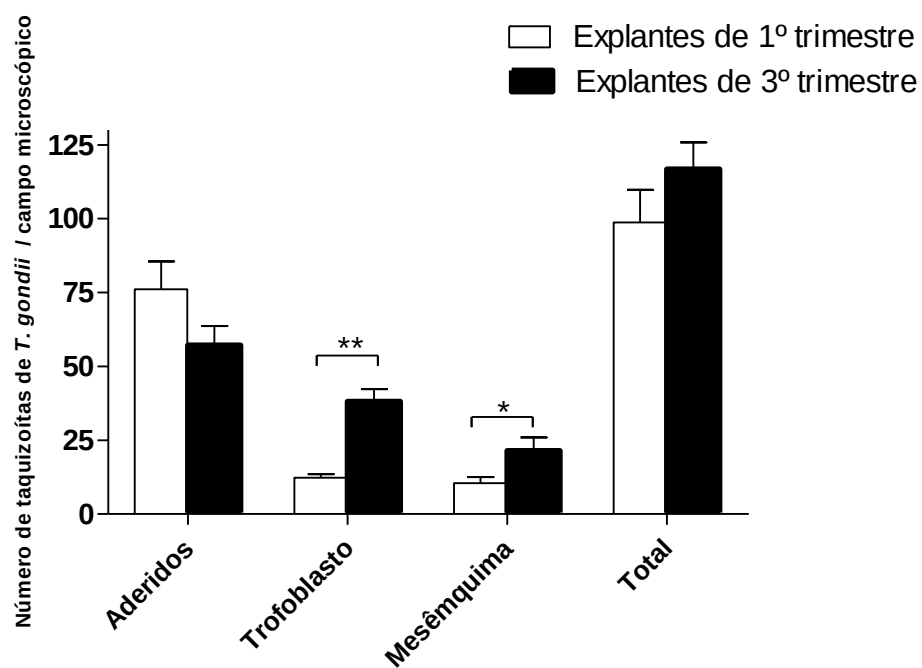


Figura 6: Esquema do modelo proposto para o controle do parasitismo dependente de MIF nos explantes de primeiro trimestre (**A-C**) comparado com explantes de terceiro trimestre (**D-F**). **A:** ausência de infecção e estimulação. MIF está expresso em grandes quantidades nas células citotrofoblásticas e grandes quantidades do receptor de MIF estão expressas na camada de sinciotrofoblasto. **B:** infecção por *T. gondii*. MIF é liberado do citotrofoblasto e se liga ao seu receptor na camada de sinciotrofoblasto. **C:** Resultado da interação parasito-hospedeiro. É possível notar que notar pequeno número de parasitos dentro do trofoblasto ou no mesênquima e um grande número de parasitos aderidos à superfície da camada de trofoblasto. **D:** Ausência de infecção e estimulação: pequenas quantidade de MIF e seu receptor expressos no trofoblasto. **E:** infecção por *T. gondii*. A produção de MIF por células trofoblásticas é aumentada, entretanto, não há aumento na liberação de MIF. **F:** Resultado da interação parasito-hospedeiro. É possível notar grande quantidade de parasitos dentro do trofoblasto e dentro do mesênquima e pequenos número de parasitos aderidos às células trofoblásticas.

FIGURA 6:

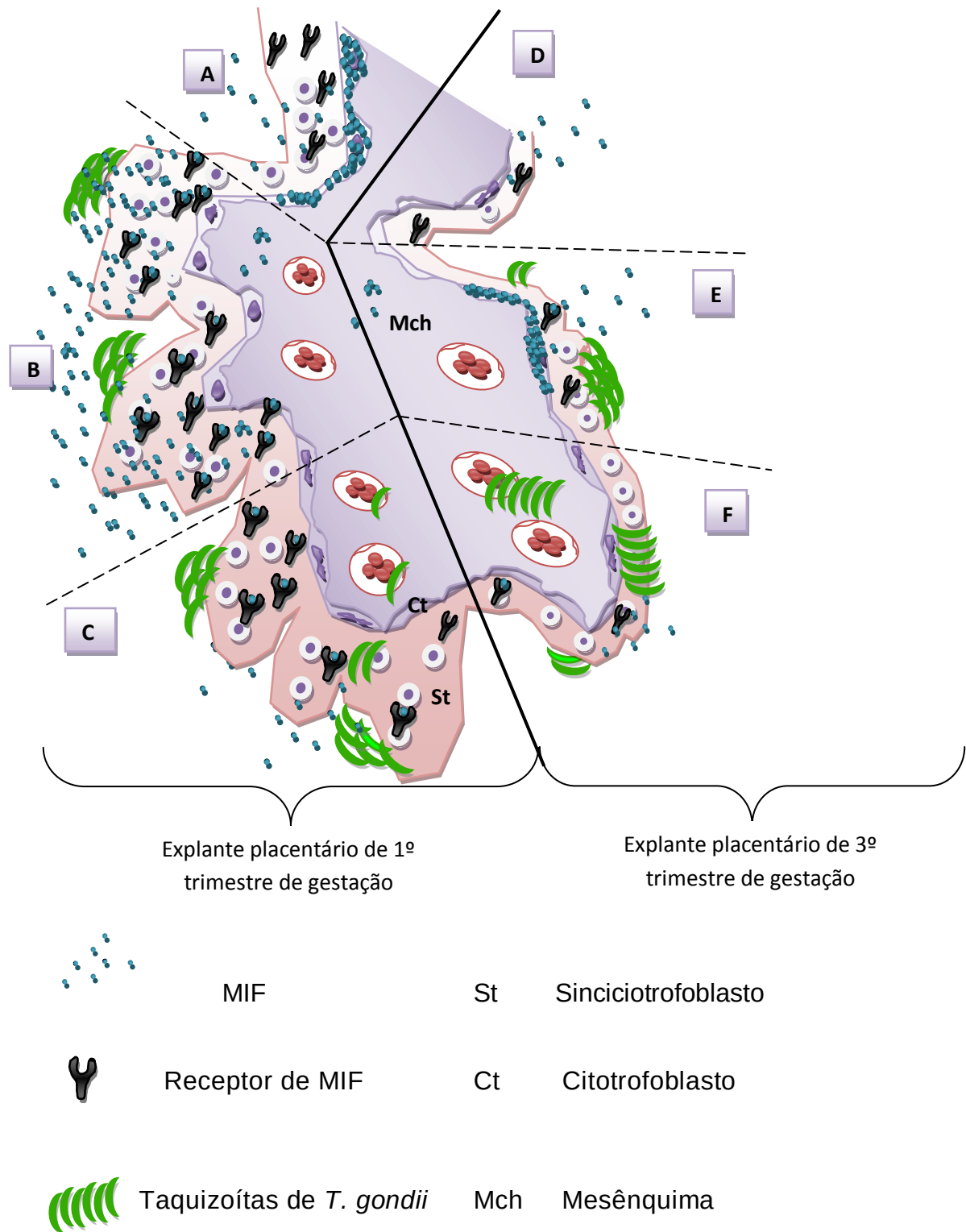


Figura 7: A) Dados referentes aos experimentos de inibição das MAPk em explantes de placenta humana de primeiro trimestre de gestação. Os explantes foram tratados com MIF (100 ng/mL); SP600125 (inibidor da JNK); PD98059 (inibidor da ERK1/2) e apiginina. Todos os inibidores foram adicionados na concentração de (10 μ M). Culturas controle foram realizadas somente com meio de cultura. A seguir os vilos foram infectados ou não com a cepa RH 2F1 de *T. gondii* e após 24 horas os tratamentos foram repetidos. Os explantes placentários foram coletados e os parasitos foram quantificados por reação enzimática para detecção da atividade da beta-galactosidase. Os valores médios obtidos para diferentes estímulos foram comparados com os controles não tratados pela análise de variância *One way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $*p < 0,05$.

(B, C e D) Sobrenadantes de cultura provenientes destes experimentos foram utilizados para quantificação de citocinas (TGF β 1, IL-13 e IL-10 respectivamente) pelo método ELISA. Os tecidos tratados infectados ou não foram comparados com os respectivos controles pela análise de variância *One way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. As comparações entre os grupos infectados e não infectados foram realizadas pelo *Two way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. ($*P < 0,05$; $** P < 0,001$; $** P < 0,0001$)

Figura 7

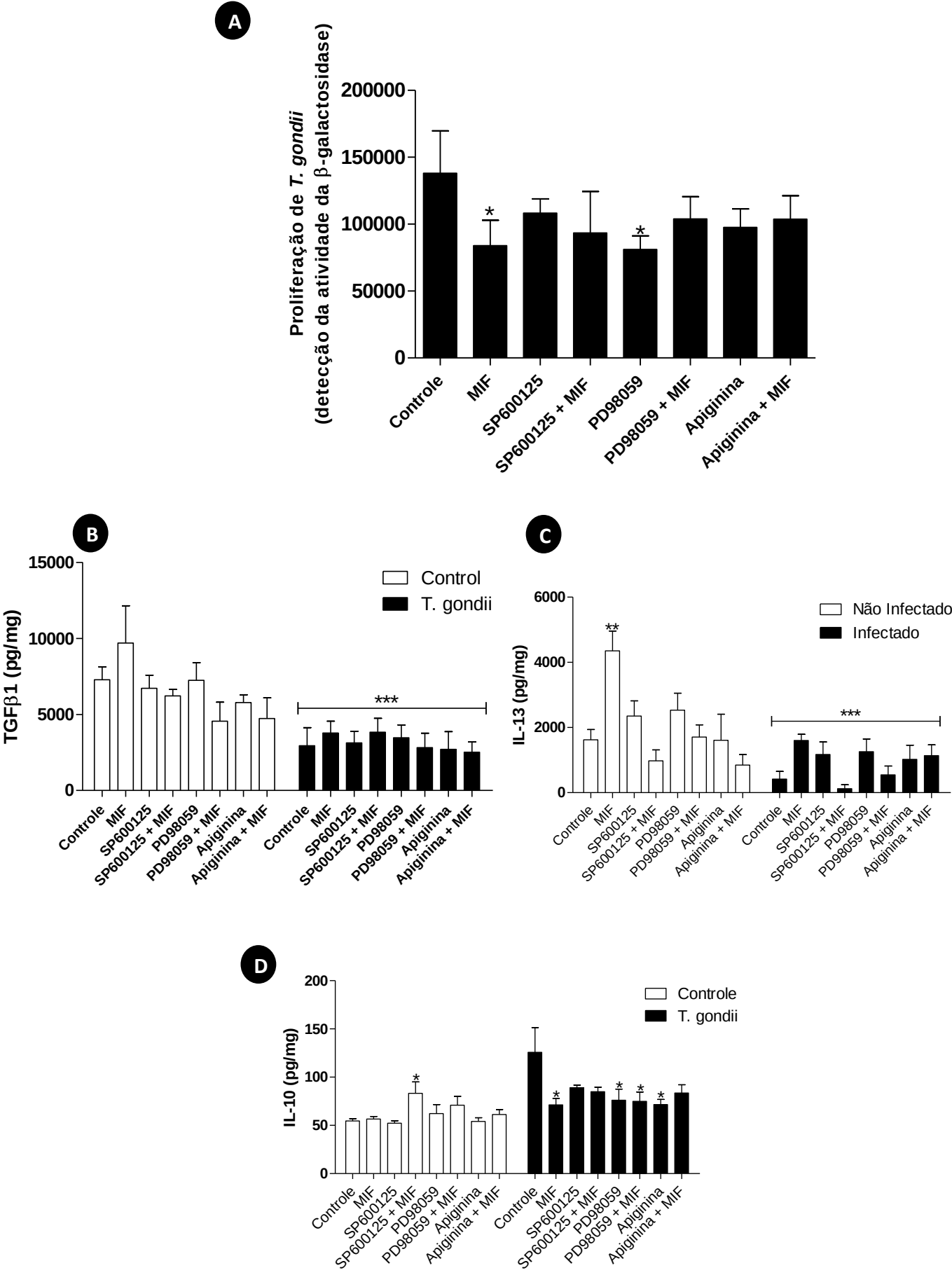


Figura 8: (A e B) Dados referentes aos experimentos de inibição das MAPk em explantes de placenta humana de terceiro trimestre de gestação. Os explantes foram tratados com MIF (100 ng/mL); SP600125 (inibidor da JNK); SB203580 (inibidor da p38); PD98059 (inibidor da ERK1/2) e apiginina. Todos os inibidores foram adicionados na concentração de (10 μ M). Culturas controle foram realizadas somente com meio de cultura. A seguir os vilos foram infectados ou não com a cepa RH 2F1 de *T. gondii* e após 24 horas os tratamentos foram repetidos. Os explantes placentários foram coletados e os parasitos foram quantificados por reação enzimática para detecção da atividade da beta-galactosidase. Os valores médios obtidos para diferentes estímulos foram comparados com os controles não tratados pela análise de variância *One way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,001$.

(B, C e D) Sobrenadantes de cultura provenientes destes experimentos foram utilizados para quantificação de citocinas (TGF β 1, IL-13 e IL-10 respectivamente) pelo método ELISA. Os tecidos tratados infectados ou não foram comparados com os respectivos controles pela análise de variância *One way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. As comparações entre os grupos infectados e não infectados foram realizadas pelo *Two way ANOVA* e com pós-teste de Bonferroni. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; ** $P < 0,0001$)

Figura 8

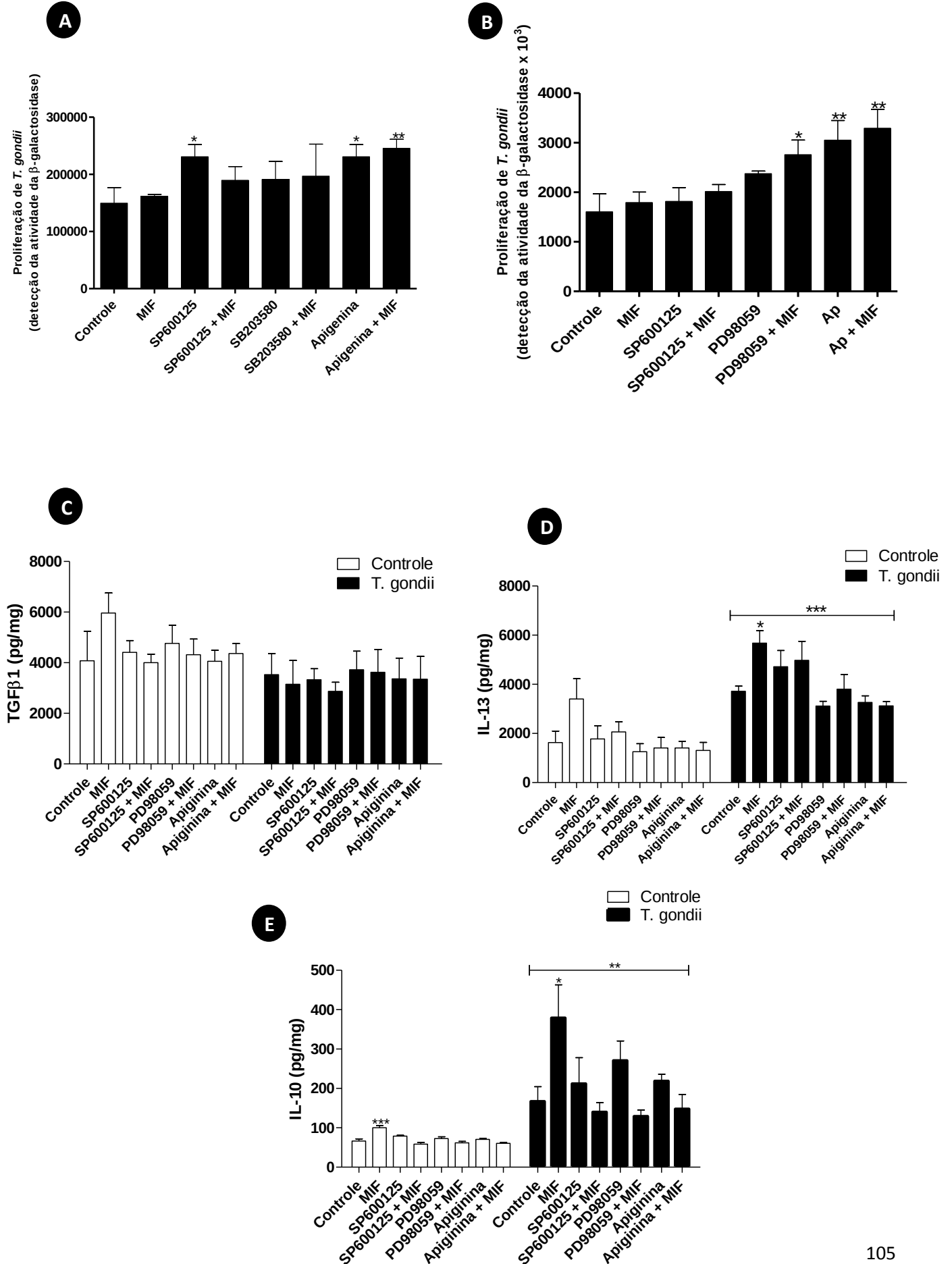
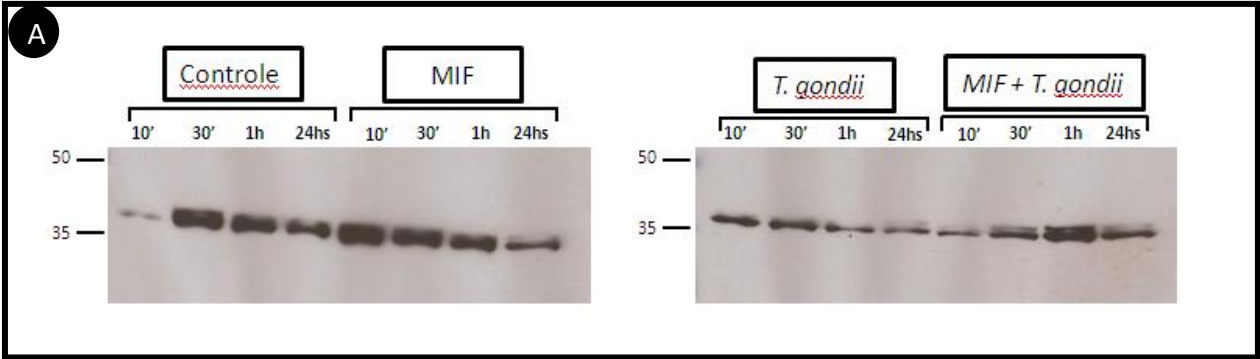


Figura 9: Cinética de fosforilação de ERK1/2 em tecidos de placenta humana de primeiro **(A)** e terceiro **(B)** trimestre de gestação. Os explantes foram tratados ou não com MIF e infectados ou não por *T. gondii*. A fosforilação foi detectada pela reação de Western blotting seguindo uma cinética de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 24 horas.

(C e D): Imunolocalização da ERK1/2 fosforilada em tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação respectivamente. As imunomarcações presentes preferencialmente na camada de citotrofoblasto estão representadas por setas. A expressão de ERK1/2 foi identificada pela imunofosfatase e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer.

Figura 9

pERK1/2 1º trimestre



pERK1/2 3º trimestre

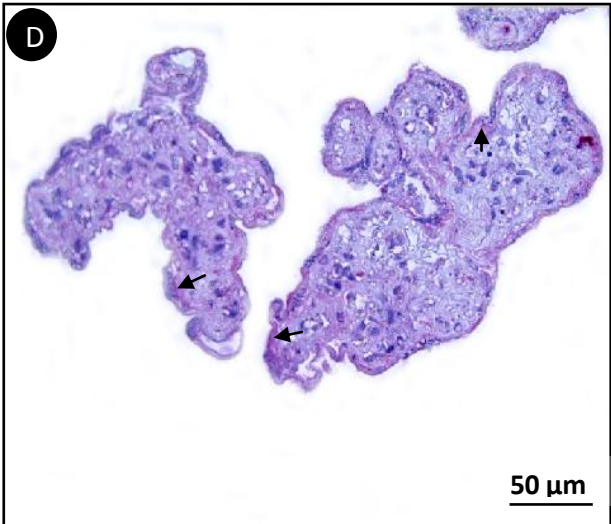
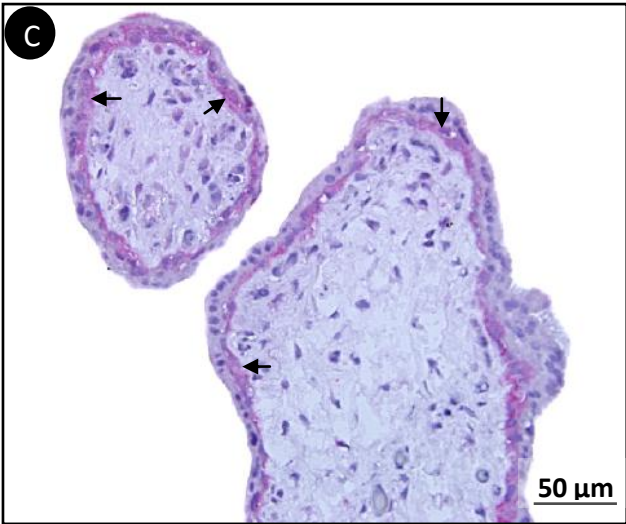
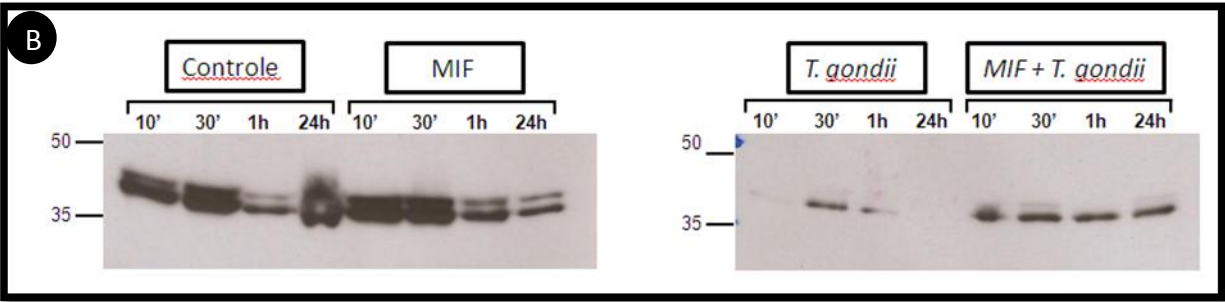
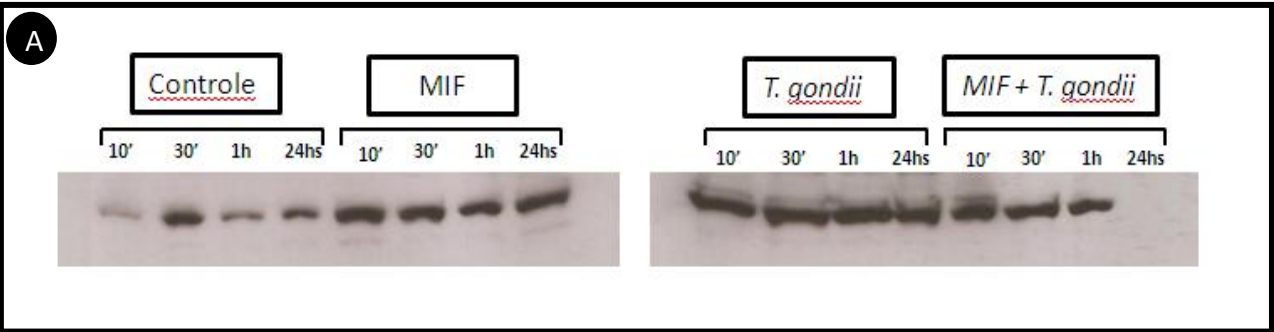


Figura 10: Cinética de fosforilação de P38 em tecidos de placenta humana de primeiro **(A)** e terceiro **(B)** trimestre de gestação. Os explantes foram tratados ou não com MIF e infectados ou não por *T. gondii*. A fosforilação foi detectada pela reação de Western blotting seguindo uma cinética de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 24 horas.

(C e D): Imunolocalização da P38 fosforilada em tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação respectivamente. As imunomarcações presentes preferencialmente na camada de sinciciotrofoblasto estão representadas por setas. A expressão de P38 foi identificada pela imunofosfatase e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer.

Figura 10

pP38 1º trimestre



pP38 3º trimestre

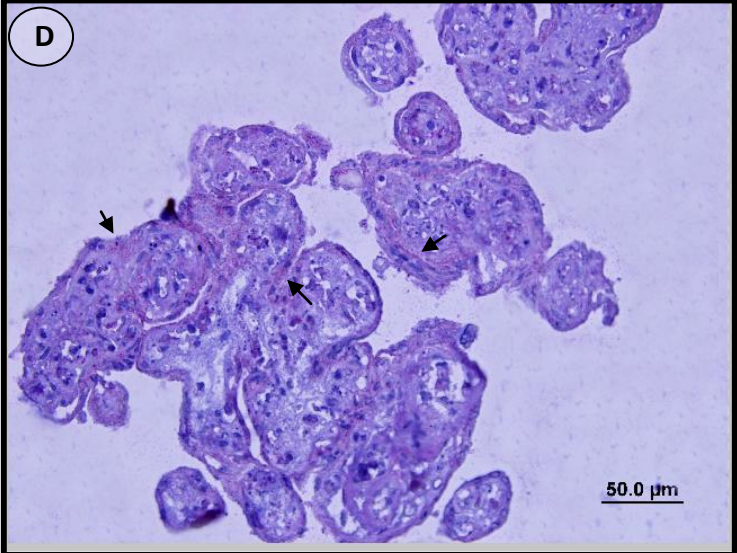
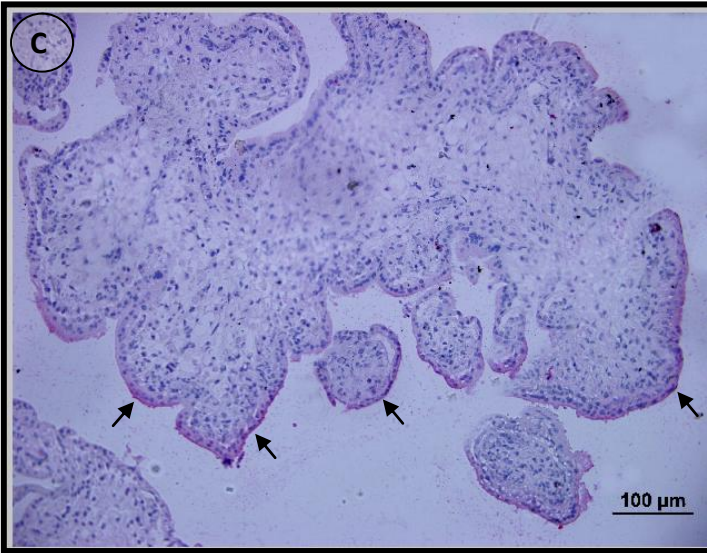
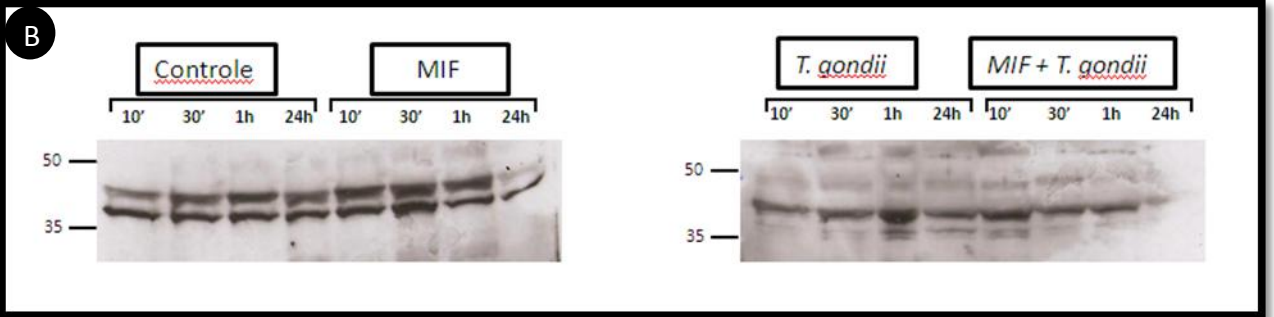


Figura 11: Cinética de fosforilação de JNK em tecidos de placenta humana de primeiro **(A)** e terceiro **(B)** trimestre de gestação. Os explantes foram tratados ou não com MIF e infectados ou não por *T. gondii*. A fosforilação foi detectada pela reação de Western blotting seguindo uma cinética de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 24 horas.

(C e D): Imunolocalização da JNK fosforilada em tecidos de primeiro e terceiro trimestre de gestação respectivamente. As imunomarcações presentes preferencialmente na camada de sinciciotrofoblasto estão representadas por setas. A expressão de JNK foi identificada pela imunofosfatase e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer.

Figura 11

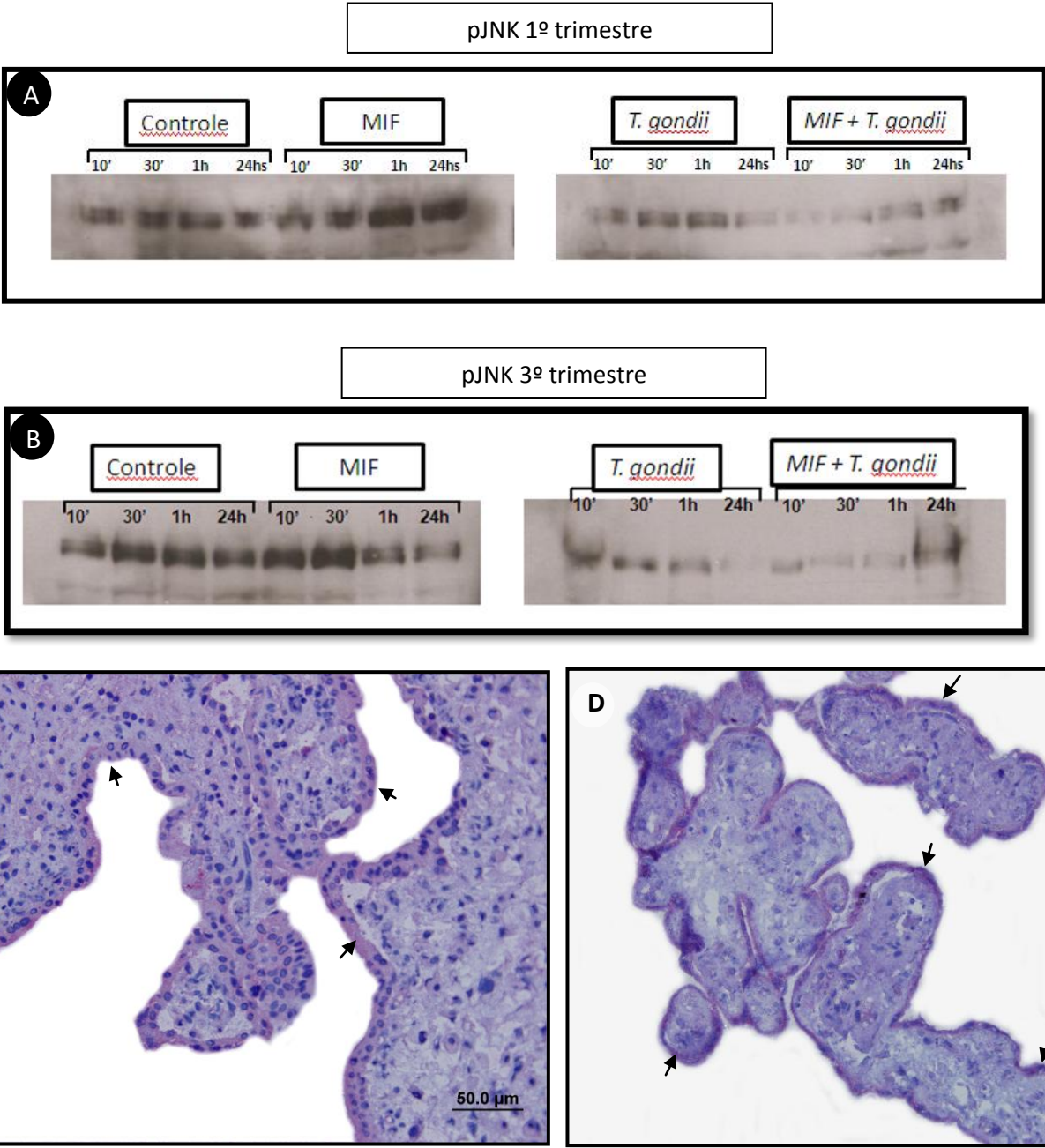


Figura 12 (A e B): Imunolocalização da IDO em explantes de placenta humana de primeiro e terceiro trimestre de gestação respectivamente. A expressão de IDO foi identificada pela imunofosfatase e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer. Insertos na figuram mostram as imunomarcações da IDO na região de mesênquima dos explantes em maior aumento (aumento original 100x).

Figura 12

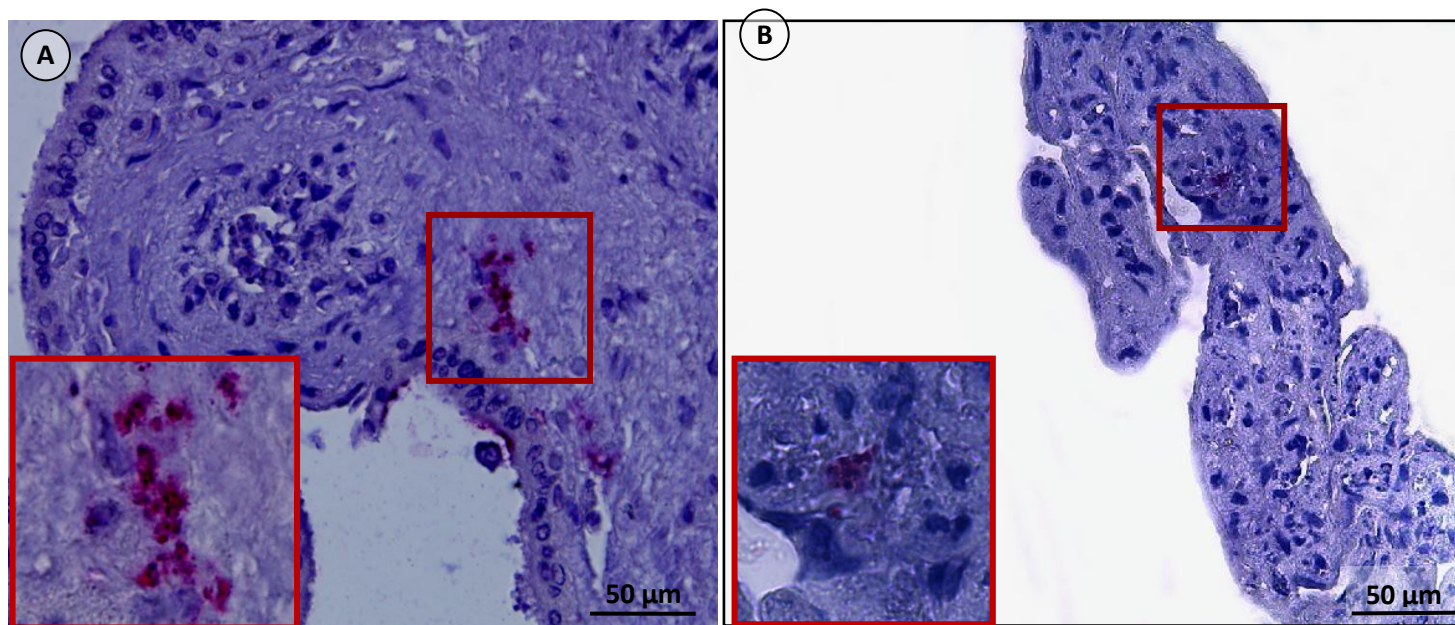


Figura 13: Alterações de peso corporal em animais C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação animais do tipo selvagem. Animais infectados com 05 ou 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* foram acompanhados durante 21 dias quanto a perda de peso corporal. Os asteriscos (*) indicam a diferença de peso com relação ao dia zero (anterior à infecção). O sustenido (#) indica as comparações entre C57BL/6 MIF^{-/-} e C57BL/6 selvagem infectados com o mesmo número de cistos. As comparações foram feitas pelo teste *t* de Student ([#]*p*<0.01; **p*<0.05; ***p*<0,001).

Figura 13

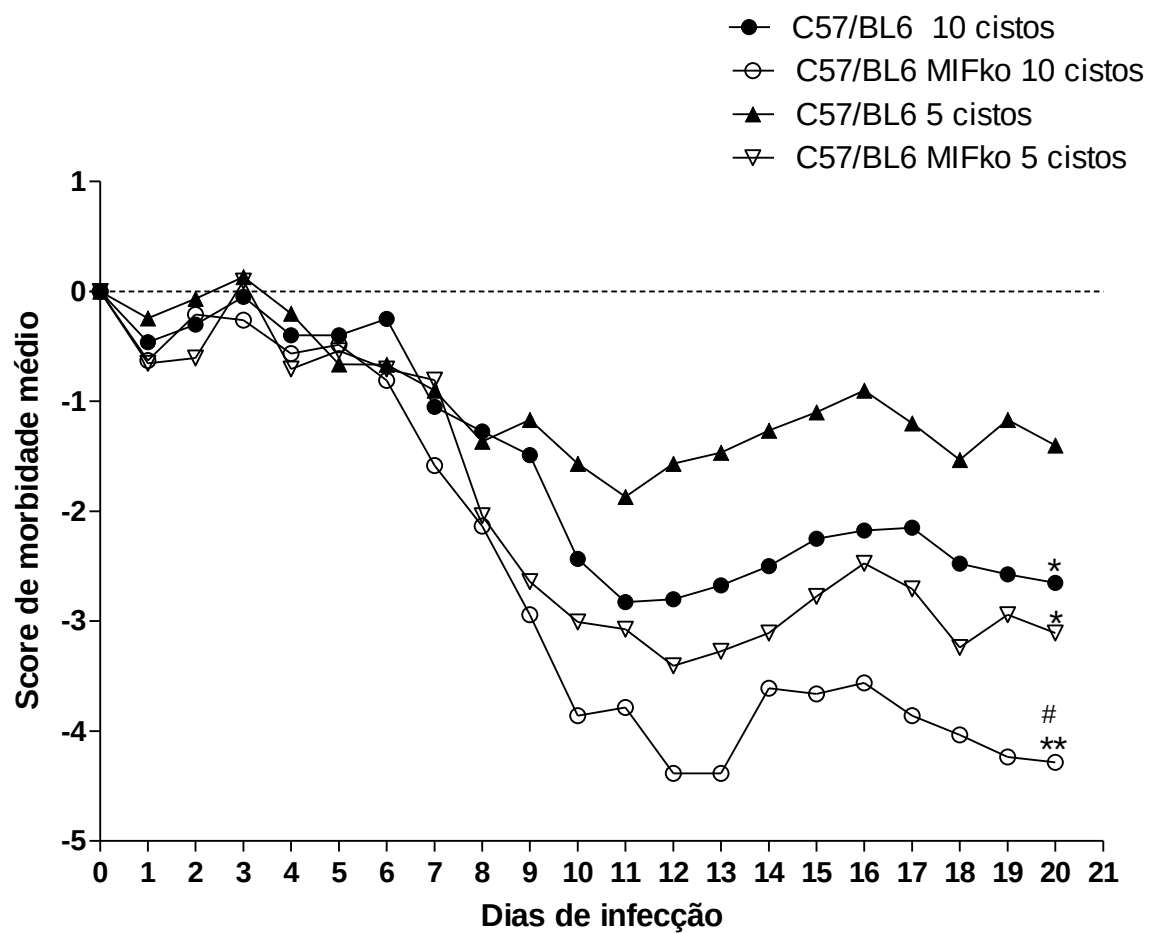


Figura 14: **(A)** *Imunoblotting* para detecção da IDO em úteros de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação animais do tipo selvagem. Os úteros foram obtidos de fêmeas não prenhes e não infectadas (NP/NI), não prenhes e infectadas pela cepa ME-49 de *T. gondii* (NP/I), prenhes e não infectadas (P/NI) e fêmeas prenhes e infectadas (P/I). **(B)** *Imunoblotting* para detecção da beta actina em úteros de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação animais do tipo selvagem. Os úteros foram obtidos de fêmeas não prenhes e não infectadas (NP/NI), não prenhes e infectadas pela cepa ME-49 de *T. gondii* (NP/I), prenhes e não infectadas (P/NI) e fêmeas prenhes e infectadas (P/I). **(C)** Dados quantitativos obtidos da densitometria das bandas detectadas na reação de *Western blotting*.

Figura 14

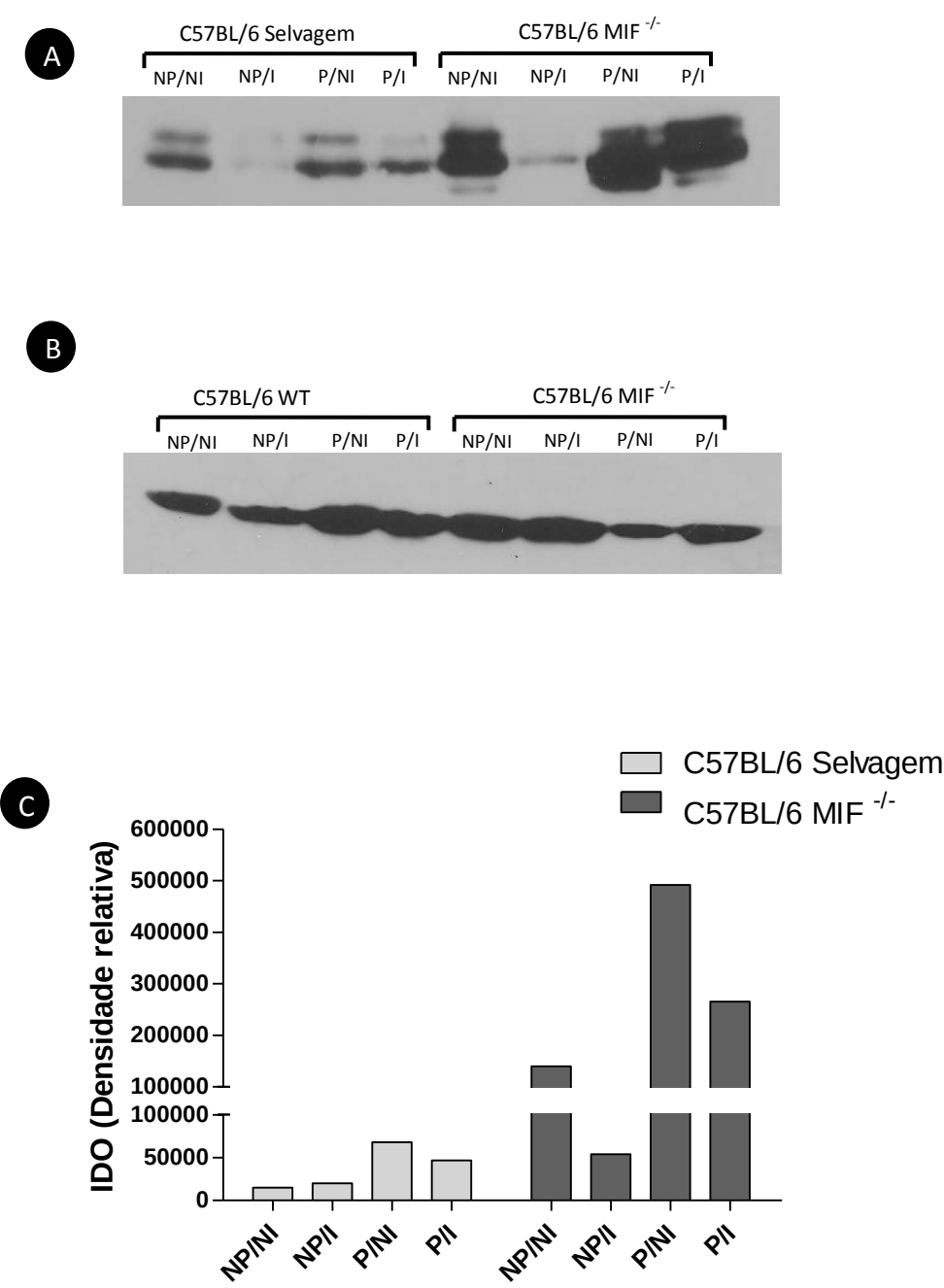


Figura 15: (A) Dados quantitativos obtidos da densitometria das bandas obtidas na reação de *Western blotting* para detecção de COX-2 em úteros de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação animais do tipo selvagem. Os úteros foram obtidos de fêmeas não prenhes e não infectadas (NP/NI), não prenhes e infectadas pela cepa ME-49 de *T. gondii* (NP/I), prenhes e não infectadas (P/NI) e fêmeas prenhes e infectadas (P/I).

Curva de associação entre os parâmetros obtidos para IDO e COX-2 em animais C57BL/6 MIF^{-/-} **(B)** e animais C57BL/6 tipo selvagem **(C)**.

Figura 15

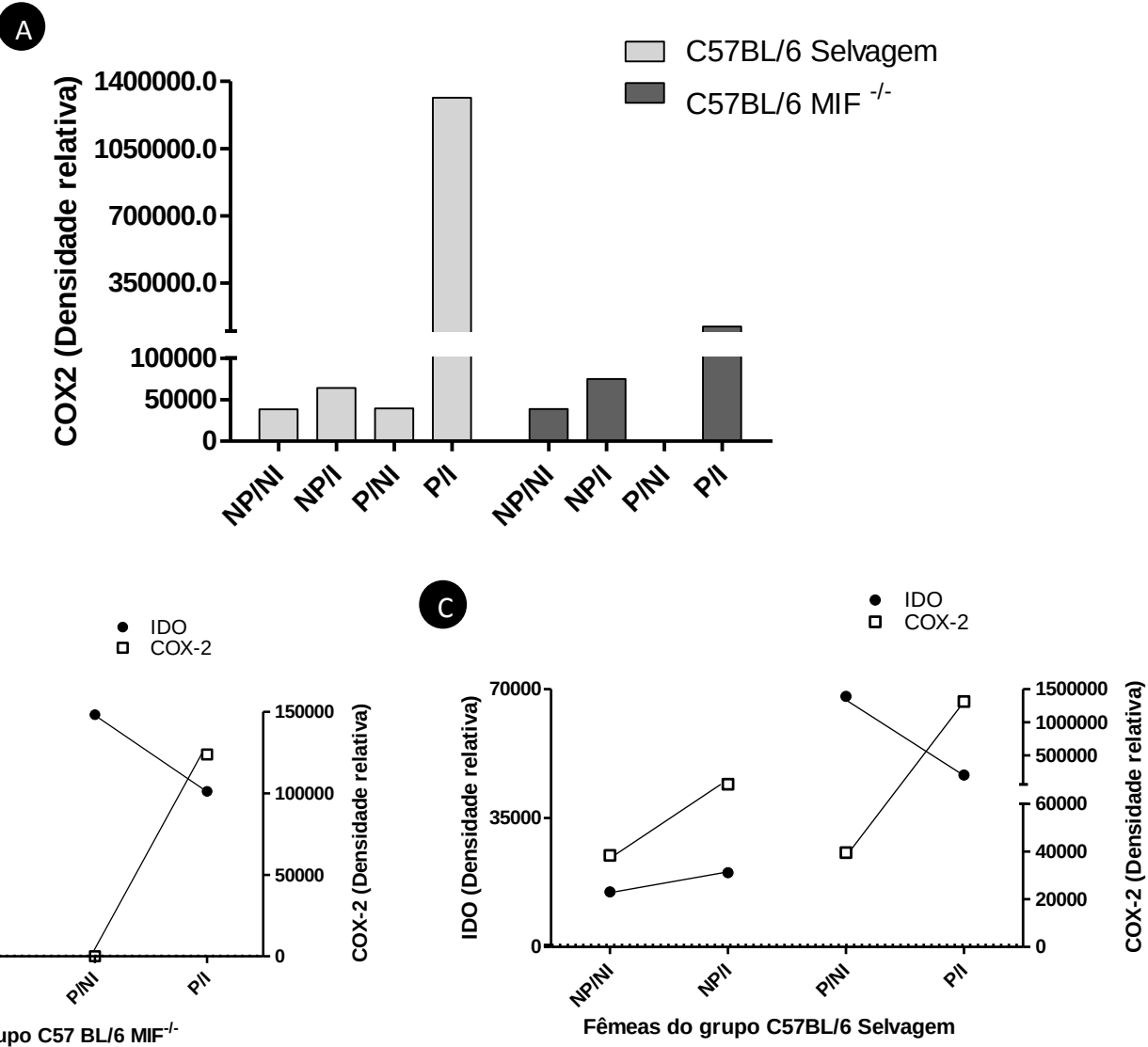


Figura 16: Dados de secreção de citocinas no soro de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação animais do tipo selvagem. Os soros foram obtidos de fêmeas não prenhes e não infectadas (NP/NI), não prenhes e infectadas pela cepa ME-49 de *T. gondii* (NP/I), prenhes e não infectadas (P/NI) e fêmeas prenhes e infectadas (P/I). As citocinas IL-6 **(A)**, INF γ **(B)**, TNF **(C)**, IL-4 **(D)**, IL-10 **(E)** foram detectadas por citometria de fluxo e expressos em pg/mL. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* de Student. As comparações entre fêmeas do mesmo grupo estão indicadas por barras e foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As comparações entre C57BL/6 MIF^{-/-} e C57BL/6 selvagem estão indicadas por símbolo sustentado # $p < 0,05$.

Figura 16

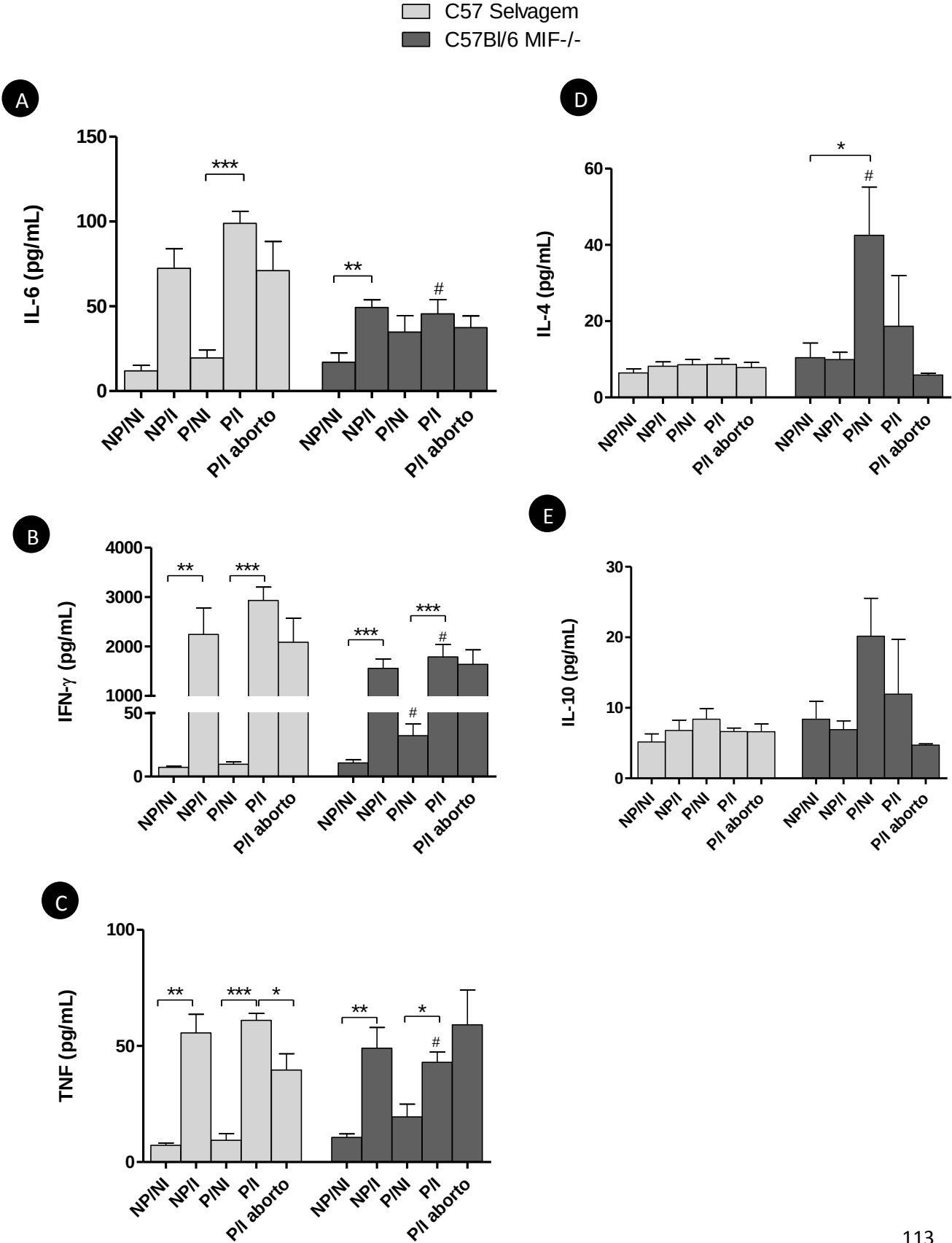


Figura 17: Secreção de óxido nítrico (NO) no soro de fêmeas C57BL/6 MIF^{-/-} em comparação animais do tipo selvagem. Os soros foram obtidos de fêmeas não prenhes e não infectadas (NP/NI), não prenhes e infectadas pela cepa ME-49 de *T. gondii* (NP/I), prenhes e não infectadas (P/NI) e fêmeas prenhes e infectadas (P/I). As análises estatísticas foram realizadas entre as médias obtidas para cada grupo pelo teste *t* de Student. As comparações entre C57BL/6 MIF^{-/-} e C57BL/6 selvagem estão indicadas por símbolo sustentado #*p*<0,05.

Figura 17

