

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

**A Susceptibilidade de Células Trofoblásticas Humanas (Linhagem Bewo) a *Toxoplasma gondii* é Aumentada por Interleucina-10 (IL-10) e Fator Transformador de Crescimento Beta1 (TGF- $\beta$ 1)**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

**BELLISA DE FREITAS BARBOSA**

**Uberlândia / 2007**

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

**A Susceptibilidade de Células Trofoblásticas Humanas (Linhagem Bewo) a *Toxoplasma gondii* é Aumentada por Interleucina-10 (IL-10) e Fator Transformador de Crescimento Beta1 (TGF- $\beta$ 1)**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

**Mestranda: Bellisa de Freitas Barbosa**

**Orientadora: Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro**

**Uberlândia / 2007**

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

**A Susceptibilidade de Células Trofoblásticas Humanas (Linhagem Bewo) a *Toxoplasma gondii* é Aumentada por Interleucina-10 (IL-10) e Fator Transformador de Crescimento Beta1 (TGF- $\beta$ 1)**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

**Mestranda: Bellisa de Freitas Barbosa**

**Orientadora: Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro**

**Co-orientador: Dr. José Roberto Mineo**

**Uberlândia / 2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de  
Catalogação e Classificação

B238s

Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-

A susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) a *Toxoplasma gondii* é aumentada por interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento beta1 (TGF- $\beta$ 1) / Bellisa de Freitas Barbosa, 2007.

110f.: il.

Orientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Inclui bibliografia.

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

CDU: 616.993.1

## *Dedicatória*

*Este trabalho é uma conquista grandiosa que dedico especialmente aos meus pais, Maria de Freitas Barbosa e João Vieira Barbosa, a minha irmã Julice de Freitas Barbosa, e a minha tia, Abadia Vieira Barbosa, a qual eu considero como uma segunda mãe.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro pela sua incontestável competência na elaboração e realização deste trabalho.*

*Muito obrigada pela sua paciência, motivação, atenção, amizade e especialmente pela sua presença marcante em todos os momentos de dificuldade. Os conhecimentos adquiridos durante esta e outras etapas de minha vida têm uma grande participação sua.*

*Agradeço ao professor Dr. José Roberto Mineo pela sua importante colaboração na execução deste trabalho. Obrigada pela sua competência, pela receptividade ao Laboratório de Imunologia, atenção nos momentos difíceis e principalmente por me co-orientar. Tenho completa admiração pela sua inteligência e obrigada por me deixar compartilhar e adquirir um pouco dela.*

*Agradeço a Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva pela sua importante cooperação na realização deste trabalho. Obrigada pela sua boa vontade no esclarecimento de dúvidas, pelas suas relevantes idéias, pelos auxílios em bancadas, pela atenção e competência. Enfim, agradeço imensamente sua participação.*

## ***Agradecimentos***

Agradeço a todas as pessoas envolvidas na realização deste trabalho:

- Ao professor Dr. José Roberto Mineo pela cooperação na execução do trabalho, pelas idéias, reuniões e apoio financeiro para a aquisição de materiais e reagentes;
- A Dra. Deise Aparecida de O. Silva por contribuir com os procedimentos de cultura, realização dos ensaios imunológicos e padronização dos protocolos;
- Às amigas Karine Rezende e Janaína Lobato pelos grandes auxílios na manutenção da cultura, pela paciência e pelos seus conhecimentos e amizades a mim oferecidos;
- Aos técnicos do Laboratório de Imunologia, Tomáz (Junão) e Andréia, por contribuir com a limpeza e esterilização dos materiais utilizados na cultura;
- Aos técnicos do Laboratório de Histologia, Hélió e Richard, pela experiência nos procedimentos de microscopia;
- À professora Dra. Janethe Deolina Oliveira Pena pelo auxílio na preparação do trabalho;
- À professora Dra. Neide Maria da Silva pela sua experiência em cultura e esclarecimento de dúvidas;

- Às grandes amigas Idessania Nazareth Costa, Mariana Bordini Angeloni, Lorena de Almeida Santana e Angelica de Oliveira Gomes, que sempre estiveram comigo. Muito obrigada pela ajuda e amizade;

- Aos colegas do Laboratório de Imunologia, Carol Salomão, Samantha Béla, Cristiane Bernardes, e Cristina, que tanto me ajudaram na preparação de pipetas para esterilização, além do grande apoio a mim oferecido;

- A Taísa Carrijo e Ananda Vicentine, pela amizade e companheirismo;

- Aos secretários Lucileide, Neto, Juscélia e Max;

- A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

Resumo.....	XI
Abstract.....	XII
<b>1. Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	13
1.1.1. Interação parasito-hospedeiro.....	13
1.2. Formas infectantes e ciclo biológico.....	17
1.3. Cepas de <i>T. gondii</i> .....	19
1.4. A toxoplasmose.....	20
1.4.1. Pacientes imunocomprometidos.....	20
1.4.2. Forma congênita.....	21
1.5. Imunidade dos hospedeiros.....	24
1.5.1 Mecanismos de imunomodulação e evasão do parasito.....	28
1.6. Imunologia da gestação.....	32
1.6.1. Placenta humana.....	36
1.6.2. Células trofoblásticas.....	38
1.6.3. Células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo).....	41
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>46</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>47</b>
4.1. Cultura de células BeWo e HeLa.....	47
4.2. Manutenção da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	48
4.2.1. Manutenção <i>in vivo</i> .....	48
4.2.2. Manutenção <i>in vitro</i> .....	48
4.3. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura para IL-10 e TGF- $\beta$ 1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por <i>T. gondii</i> .....	48
4.4. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por <i>T. gondii</i> e tratadas com IL-10 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos.....	49

4.5. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por <i>T. gondii</i> e tratadas com anti-IL-10 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos.....	50
4.6. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por <i>T. gondii</i> e tratadas com TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos.....	51
4.7. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por <i>T. gondii</i> e tratadas com anti-TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos.....	52
4.8. Teste Imunoenzimático ELISA Captura para IL-10 e TGF- $\beta$ 1.....	52
4.8.1. Detecção de IL-10.....	53
4.8.2. Detecção de TGF- $\beta$ 1.....	53
4.9. Análise Estatística.....	54
<b>5. Resultados.....</b>	<b>55</b>
5.1. Produção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	55
5.2. Influência de IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ na proliferação intracelular e no índice de infecção de <i>T. gondii</i> em células BeWo.....	55
5.3. Influência de IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ na proliferação intracelular e no índice de infecção de <i>T. gondii</i> em células HeLa.....	58
<b>6. Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>72</b>
<b>8. Parecer da comissão de ética.....</b>	<b>73</b>
<b>9. Figuras.....</b>	<b>75</b>
<b>10. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>82</b>

## RESUMO

As possíveis causas relacionadas à susceptibilidade de células BeWo à infecção por *Toxoplasma gondii* foram investigadas no presente estudo. Células HeLa foram usadas nas mesmas condições como parâmetros de controle. Ambas células foram submetidas, antes e depois da infecção por *T. gondii*, a diferentes tratamentos por rIL-10, rTGF- $\beta$ 1, anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$ . rIFN- $\gamma$ , quando necessário, foi apenas adicionado após infecção pelo parasito. Em seguida, as células foram fixadas, coradas e os parasitos quantificados sob microscópio de luz quanto à proliferação intracelular e porcentagem de células infectadas a cada 100 células examinadas. Os tratamentos com rIL-10 e rTGF- $\beta$ 1 proporcionaram um aumento considerável da proliferação intracelular e da invasão de *T. gondii* em células BeWo, ao contrário do observado em células HeLa. Surpreendentemente, rIFN- $\gamma$  provocou o mesmo efeito. Entretanto, apenas o tratamento simultâneo de anti-IL-10 com rIFN- $\gamma$  foram capazes de controlar a replicação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, enquanto que anticorpos contra TGF- $\beta$  não interferiram na multiplicação ou no índice de infecção dessas células. Esses resultados demonstram que células BeWo possuem uma fisiologia diferente de células HeLa, sugerindo que o papel do trofoblasto em manter um microambiente placentário favorável à gestação pode facilitar a infecção de tecidos placentários.

**Palavras chave:** trofoblasto humano, imunomodulação, *Toxoplasma gondii*, interface materno-fetal

**ABSTRACT**

The present study aimed to investigate the probable causes of BeWo cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in comparison with HeLa cells that served as controls. Both cell types were submitted to different treatments with recombinant cytokynes (rIL-10 and rTGF- $\beta$ 1) or their respective antibodies (anti-IL-10 and anti-TGF- $\beta$ ) before or after *T. gondii* infection. In some experiments, rIFN- $\gamma$  was added after the parasite infection. Then, cells were fixed, stained and parasites quantified under optical microscopy with regards to intracellular proliferation and infection index (percentage of infected cells per 100 examined cells). Treatments with rIL-10 and rTGF- $\beta$ 1 induced a considerable augment in *T. gondii* intracellular proliferation and invasion to BeWo but not in Hela cells. Surprisingly, treatment with rIFN- $\gamma$  caused the same effect, but only the simultaneous treatment with anti-IL-10 and rIFN- $\gamma$  was able to control the intracellular replication of *T. gondii* in BeWo cells. Also, anti-TGF- $\beta$  antibodies showed no influence on the intracellular proliferation or infection index of the parasite to these host cells. These results indicate that BeWo cells may have a different physiologic function in relation to HeLa cells, suggesting that the role of trophoblast cells in maintaining a placental microenvironment that is favorable to pregnancy may facilitate the infection for placental tissues.

**Key words:** human trophoblast, immunomodulation, *Toxoplasma gondii*, maternal-fetal interface.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii*

Parasitas intracelulares obrigatórios garantem a sua sobrevivência pelo desenvolvimento de dependência vital das células de seu hospedeiro. A maioria desses parasitos são protozoários, muitos dos quais são responsáveis por doenças benignas ou letais em animais e humanos.

O filo Apicomplexa é constituído por alguns gêneros de protozoários potencialmente patogênicos aos animais e humanos como as espécies de *Plasmodium*, *Eimeria*, *Cryptosporidium*, *Neospora*, *Theileria* e *Toxoplasma gondii*.

#### 1.1.1. Interação parasito-hospedeiro

*T. gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e família Sarcocystidae (Rey, 2001). Foi primeiramente visualizado em 1908 em células mononucleares do baço e do fígado no roedor norte americano *Ctenodactylus gondi*. No entanto, no mesmo ano, o parasito foi encontrado em coelhos com paralisia no Brasil. A causa de doenças em humanos e animais apenas mereceu especial atenção quando um oftalmologista, em 1923, descreveu o primeiro relato de cistos presentes na retina de uma criança de onze meses de idade com hidrocefalia congênita (Remington; Klein, 2001).

Morfologicamente, *T. gondii* se assemelha às demais células eucarióticas. Há presença de um núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, lisossomos e retículo endoplasmático. O parasito possui uma forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana. Certas vezes, apresenta-se oval, indicando o início de um processo de divisão celular (Rey, 2001). A película externa consiste de três membranas: a membrana plasmática

propriamente dita, que é contínua por natureza, e mais duas membranas justapostas interrompidas por fenestrações, principalmente no pólo anterior do parasito (Ferro, 2000).

A região anterior do parasito é caracterizada pela presença do complexo ou aparelho apical, onde se encontra o conóide. O complexo apical constitui uma prega localizada na membrana plasmática do parasito, delimitando uma depressão central. O conóide é uma estrutura em forma de cone oco, formada por três anéis de microtúbulos. Destes três anéis, dois estão dispostos na própria região apical e o terceiro está localizado mais posteriormente, sendo conhecido como anel polar. Existem de seis a oito microtúbulos, que se cruzam obliquamente, entre o anel apical inferior e o anel polar. E, do anel polar, partem vinte e dois microtúbulos que se dispõem espiralmente sob o complexo da membrana interna até a região posterior do parasito. No interior do conóide estão as micronemas e roptrias (Ferro, 2000).

Além de organelas típicas de seres eucariontes, *T. gondii* apresenta ainda micronemas, roptrias e grânulos densos. As micronemas são organelas dispostas ao longo do principal eixo do parasito e secretam uma diversidade de moléculas adesivas (Carruthers, 2002). O conteúdo protéico das micronemas é descarregado durante a adesão do parasito à célula hospedeira. Já foram relatadas onze proteínas (MIC-1 a MIC-11), dentre as quais MIC-1 é uma lectina específica para lactose, que se liga aos receptores glicoproteicos para este açúcar na superfície da célula hospedeira (Lourenço et al., 2001). MIC-2 é uma proteína aderente transmembrânica, cujo domínio extracelular contém integrinas e trombospondinas capazes de se ligarem a moléculas de glicosaminoglicanas, como heparan sulfato, da célula hospedeira (Sibley, 2004; Wan et al., 1997). No entanto, MIC-2 está associada a uma outra proteína acessória, M2AP. O complexo formado é liberado na superfície de *T. gondii* e logo se liga aos receptores das células hospedeiras. Após a secreção, este complexo é translocado para o pólo posterior do parasito, fato que requer auxílio de seus microfilamentos de actina, para ser finalmente liberado

do protozoário. Portanto, pode-se afirmar que MIC-2 / M2AP participa diretamente da adesão de *T. gondii* nas células do hospedeiro (Carruthers, 2002; Sibley, 2004). Barragan e colaboradores (2005) demonstraram que a MIC-2 de *T. gondii* se liga às moléculas de adesão do hospedeiro, como ICAM-1, permitindo ao parasito migrar até os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta, utilizando-se de uma via paracelular. Esse tipo de deslocamento parasitário permite a invasão de novos tecidos e, conseqüentemente, a disseminação mais rápida do parasito no organismo hospedeiro. MIC-3 e MIC-8 são lectinas capazes de reconhecer os receptores para glicoproteínas nas células hospedeiras (Carruthers, 2002).

Estudos recentes demonstraram que a atividade secretora das micronemas depende da concentração intracelular de cálcio (Carruthers; Sibley, 1999). O parasito é capaz de se suprir de cálcio para estimular a atividade secretória das micronemas. Para isso, possui duas proteínas quinases dependentes de cálcio, TgCDPK1 e TgCDPK2, que regulam a sua motilidade e a sua ligação com as células hospedeiras. Assim, essas proteínas quinases de *T. gondii* regulariam, de forma direta ou indireta, a atividade secretora das micronemas (Kieschnick et al., 2001).

As roptrias, geralmente de oito a dez, constitui-se por serem formações membranosas de extremidades dilatadas (Ferro, 2000). Seu conteúdo protéico é liberado durante a invasão propriamente dita do parasito e na formação do vacúolo parasitóforo, sendo responsável pela sua natureza não fusogênica e pelo recrutamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático para as proximidades do vacúolo (Kim; Weiss, 2004; Sinai et al., 1997; Sinai; Joiner, 2001). Enzimas proteolíticas como a ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração), de 70 kDa, atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (Ferro, 2000; Lycke et al., 1975). Dziadek e colaboradores (2007) demonstraram um novo atributo das roptrias, ao relatar que ROP-2 e ROP-4 ligam-se a lactoferrina humana, como um fenômeno capaz de

influenciar no processo de adesão do parasito à célula hospedeira e posterior replicação intracelular.

Os grânulos densos são organelas que descarregam seu conteúdo protéico tanto durante quanto após a invasão do parasito dentro do vacúolo parasitóforo. As proteínas dos grânulos densos possuem diferentes pesos moleculares (GRA-1 a GRA-9) e permanecem solúveis no lúmen do vacúolo parasitóforo ou associadas a ele, garantindo uma fonte de nutrição e impedindo a ligação de lisossomos ao vacúolo (Carruthers, 2002). Ahn e colaboradores (2005) caracterizaram uma nova proteína – GRA-10 – que também está envolvida na entrada de *T. gondii* na célula hospedeira e durante a sua replicação no vacúolo.

A invasão celular de *Toxoplasma* é um processo rápido, levando cerca de 15 a 20 segundos, e inclui as seguintes etapas: reconhecimento, adesão, penetração e mecanismo de defesa. As fases de reconhecimento e adesão à célula hospedeira envolvem receptores para fibronectina e laminina em ambas as células, além da atividade oriunda das moléculas adesivas das micronemas. Em seguida, ocorre a penetração propriamente dita do parasito na célula hospedeira, com o auxílio das enzimas proteolíticas oriundas das roptrias e micronemas, contando ainda com movimentos de rotação, extrusão e retração do complexo apical. O mecanismo de defesa refere-se à ação dos grânulos densos, cujas glicoproteínas impedem a fusão de lisossomos no vacúolo parasitóforo, garantindo a permanência do parasito no organismo hospedeiro (Carruthers, 2002; Ferro, 2000). Estudos com citocalasina, inibidores da polimerização de actina, mostraram que o citoesqueleto do parasito está especialmente relacionado à motilidade e à entrada na célula hospedeira (Russel, 1983).

## 1.2. Formas infectantes e ciclo biológico

*T. gondii* apresenta três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas representam a multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira, com a formação de pseudocistos ou vacúolos parasitóforos. Eles medem de 2 a 4µm de largura e de 4 a 8µm de comprimento e a sua replicação pode conduzir à morte celular e posterior invasão de células adjacentes (Montoya; Liesenfeld, 2004).

Os bradizoítas representam a multiplicação lenta do parasito na célula hospedeira, culminando com a formação de verdadeiros cistos teciduais. Um cisto tecidual pode abrigar de centenas a milhares de bradizoítas e pode estar presente em qualquer tecido do hospedeiro. Porém, é mais freqüente nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (Montoya; Liesenfeld, 2004). No interior dos cistos, os bradizoítas dividem-se por endodiogenia, uma especializada forma de divisão na qual duas células-filhas formam-se no interior da célula mãe, mantendo-se, por algum tempo, unidas pela extremidade posterior. Morfologicamente, poucas são as diferenças entre bradizoítas e taquizoítas. Ao contrário dos taquizoítas, os bradizoítas têm um núcleo situado mais posteriormente, numerosos grânulos contendo amilopectina e são mais resistentes a enzimas proteolíticas (Jacobs et al., 1960).

Os esporozoítas, que possuem um maior número de micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina que os taquizoítas, estão contidos no interior de oocistos, que são liberados juntamente com as fezes de felinos (Ferro, 2000; Montoya; Liesenfeld, 2004). Sobre condições favoráveis, os oocistos podem permanecer viáveis por aproximadamente um ano (Remington; Klein, 2001).

Apenas os gêneros *Felix* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, ou seja, desenvolvem o ciclo sexuado no epitélio intestinal, liberando oocistos no meio ambiente. Esta

liberação de oocistos pode durar, geralmente, cerca de um mês após a infecção, porém é possível detectar oocistos nas fezes de gatos até um ano pós-infecção (Rey, 2001). Quanto aos hospedeiros intermediários, o protozoário pode infectar as células de mamíferos e aves e desenvolver um ciclo tissular assexuado.

Brevemente, o ciclo de vida de *T. gondii* pode ser assim resumido: após a ingestão de cistos teciduais por gatos, a parede do cisto é rompida por enzimas proteolíticas gástricas e bradizoítas são liberados, penetrando nas mucosas do estômago e/ou do intestino delgado. No epitélio intestinal, o parasito se multiplica por esquizogonia, divisão nuclear sem a concomitante divisão citoplasmática, formando os esquizontes. Os núcleos formados migram para a região cortical do esquizonte e a membrana plasmática vai, aos poucos, individualizando-os. Este processo dá origem aos merozoítas que, por sua vez, iniciam a formação dos gametas. Ocorrida a fertilização no epitélio intestinal, uma parede de cinco camadas é formada ao redor do zigoto, originando os oocistos. Eles caem na luz intestinal e são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes, medindo cerca de 10 a 12 $\mu$ m. O amadurecimento destas estruturas dá-se através da esporulação, mecanismo que ocorre de 1 a 5 dias pós-eliminação (Dubey et al., 1998).

A esporulação segue da seguinte forma: o núcleo do oocisto divide-se duas vezes formando quatro núcleos, que migram para a região cortical; ocorre uma divisão citoplasmática separando cada dois núcleos e formando dois esporoblastos; o alongamento destes esporoblastos bem como o espessamento da parede que os separam formam dois esporocistos; em seguida ocorre divisão dos núcleos formando quatro esporozoários dentro de cada esporocisto (Dubey et al., 1998).

Quanto ao processo de infecção, o homem pode adquirir a toxoplasmose de seis maneiras: (1) através da ingestão de cistos presentes em carne crua ou mal cozida; (2) por ingestão de oocistos em frutas, verduras ou águas contaminadas por fezes de gatos ou pela sua movimentação através de vetores mecânicos (moscas, baratas, ratos); (3) transmissão transplacentária; (4) contato com taquizoítas presentes na saliva, leite e esperma; (5) através de órgãos transplantados; (6) por acidentes laboratoriais (Ferro, 2000; Jones et al., 2001a).

### **1.3. Cepas de *T. gondii***

*T. gondii* apresenta três linhagens clonais designadas como tipo I, II e III, que apresentam diferenças relacionadas à virulência e padrão epidemiológico. Normalmente, as cepas se dividem em dois extremos: altamente virulentas (tipo I) e relativamente virulentas (tipo II) ou brandas (tipo III). No entanto, a virulência de uma cepa é contextual, pois pode causar doença grave em certo hospedeiro ou infecção benigna em outros hospedeiros. Novas linhagens clonais estão sempre sendo relatadas na literatura e nomeadas “exóticas”, pelo fato de seus genótipos serem diferentes ou até mesmo uma mistura das três linhagens genéticas existentes (Boothroyd; Grigg, 2002).

As cepas do tipo I causam uma rápida mortalidade em animais susceptíveis, como as cepas RH, CAST e VEL e a C56. A toxoplasmose ocular em indivíduos imunocompetentes está muitas vezes relacionada à presença de cepas tipo I ou IV (exótica) (Grigg et al., 2001). Em contrapartida, as cepas do tipo II, como a ME49, podem ocasionar mortalidade, a qual depende da carga parasitária presente no hospedeiro e da resposta imunológica do mesmo. A infecção de camundongos CBA/Ca com a cepa ME-49 causa encefalite grave, demonstrando a susceptibilidade aumentada desses animais ao parasito (Araujo; Slifer, 2003). Howe e

colaboradores (1997) identificaram a maior frequência de linhagens clonais tipo II de *T. gondii* em infecções congênitas e indivíduos imunocomprometidos, como HIV positivos.

#### **1.4. A toxoplasmose**

*T. gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, doença que geralmente cursa de forma assintomática em indivíduos imunocompetentes. Mesmo nas infecções sintomáticas, poucas vezes a doença resulta em linfadenopatia cervical ou síndrome da mononucleose-like. Entretanto, a toxoplasmose pode ser potencialmente grave em indivíduos imunocomprometidos e em crianças infectadas congenitamente (Pinard et al., 2003).

O curso da infecção se dá em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença predominante de taquizoítas nas células hospedeiras, que se multiplicam rapidamente no interior do vacúolo parasitóforo, destroem as células e invadem os tecidos adjacentes. Na fase crônica, bradizoítas no interior de cistos teciduais estão mais presentes, especialmente no cérebro, retina e tecido muscular; como uma ação do parasito contra a imunidade do hospedeiro.

##### **1.4.1. Pacientes imunocomprometidos**

Esses pacientes incluem os indivíduos HIV positivos, aqueles que estão sob ação de drogas imunossupressoras ou que apresentam deficiências no seu sistema imunológico. Nestas situações, a toxoplasmose normalmente surge como uma reativação de uma infecção latente, uma vez que os bradizoítas no interior de cistos teciduais retornam ao seu estágio de taquizoítas. O sistema nervoso central é o local de manifestações mais graves nesses indivíduos, levando a um quadro de encefalite aguda. Outras manifestações neurológicas podem ocorrer como deficiências motoras focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais e até quadros psicóticos (Montoya; Liesenfeld, 2004; Porter; Sande, 1992). Portanto, acometimentos

neurológicos diversos podem ser consistentes com a infecção ou reinfecção ativa pelo *T. gondii* (Chaves-Borges et al., 1999).

São raras as situações em que a toxoplasmose aguda manifesta-se grave em indivíduos imunocompetentes, com poucos relatos de casos na literatura (Cal et al., 2003; Silva et al., 2001).

#### **1.4.2. Forma congênita**

A passagem transplacentária de *T. gondii* representa a forma congênita da infecção. Os taquizoítas atravessam a barreira placentária e, assim, atingem os tecidos fetais.

A prevalência da doença congênita na Bélgica e França é de dois a três casos a cada mil nascimentos. Esses dados são vinte vezes maiores quando comparados aos dados da prevalência nos Estados Unidos, onde ocorre cerca de um caso a cada dez mil nascimentos (Guerina et al., 1994).

A transmissão congênita de *T. gondii* normalmente ocorre apenas durante a fase aguda da infecção em humanos. Dessa forma, a infecção materna adquirida antes da gestação normalmente exclui o risco de transmissão congênita do parasito. No entanto, existem alguns casos não usuais de toxoplasmose congênita, quando a infecção materna ocorre antes da concepção (Vogel et al., 1996). Chemla e colaboradores (2002) relataram a transmissão vertical de *T. gondii* em gestantes infectadas poucas semanas antes da concepção ou bem no final do período gestacional, apresentando sorologia negativa ao nascimento do concepto.

O risco de transmissão congênita é menor se a infecção materna ocorrer no primeiro trimestre de gestação, no entanto, o comprometimento fetal é potencialmente mais grave, podendo chegar ao aborto. Em contrapartida, o risco de transmissão congênita se torna maior quando a infecção materna se dá no terceiro trimestre de gestação, mas, neste caso, o comprometimento fetal é menor (Jones et al., 2001a; Montoya; Liesenfeld, 2004). Mulheres

gestantes com uma infecção reativada, devido a algum fator imunodepressor, também podem transmitir a toxoplasmose.

Os recém-nascidos infectados congenitamente podem apresentar um quadro agudo subclínico ou benigno ao nascimento e durante a infância, porém, na puberdade ou idade adulta, esses indivíduos podem apresentar quadros de retinocoroidite resultantes de uma infecção não diagnosticada precocemente. Além disso, esses recém-nascidos podem ser sintomáticos, apresentando sinais clínicos graves como calcificações intracranianas, hidrocefalia, microcefalia, retinocoroidite, epilepsia, retardamento mental e até cegueira (Piper; Wen, 1999).

A verificação da presença de anticorpos maternos anti-*T. gondii* e a detecção do período gestacional em que a soroconversão materna ocorreu são de extrema relevância para determinar os riscos de infecção congênita, bem como para direcionar a uma terapêutica eficiente. Anticorpos IgM positivos podem indicar uma infecção recente, porém estudos relatam que níveis altos desses anticorpos podem permanecer na corrente sanguínea por até dois anos (Gras et al., 2004). Entretanto, anticorpos IgG em mulheres no início da gestação é indicativo de soroconversão pré-concepção, excluindo o risco de transmissão vertical do parasito, apesar de anticorpos IgG também poder estar presente em infecções recentes (Kravetz; Federman, 2005).

Embora o diagnóstico de soroconversão materna apresente algumas dificuldades na determinação de um prognóstico eficaz, que seja capaz de definir acuradamente a passagem ou não de *T. gondii* para os tecidos fetais, esforços têm sido direcionados no sentido de prevenir o contato da mãe com possíveis focos de infecção. Alguns estudos apontam os fatores de risco ligados a soroconversão primária materna. Um grupo de estudo envolvendo mulheres de 15 a 45 anos de idade na Yugoslávia identificou que o consumo de carnes cruas ou mal cozidas estava associado a 77% dos casos de soroconversão primária (Bobic et al., 1998). A mesma análise foi realizada na França e a soroconversão de mulheres também esteve ligada ao consumo de carnes

cruas ou mal cozidas e vegetais não lavados (Baril et al., 1999). Já nos Estados Unidos, a soroprevalência esteve ligada ao fato das mulheres serem estrangeiras e possuírem nível educacional precário, e a ocupações que mantêm contato com o solo, como a jardinagem (Jones et al., 2001b).

Frente a essas situações de exposição aos riscos de infecção pelo *T. gondii*, algumas recomendações são válidas para prevenir o contato com o parasito. Alimentos como carnes, vegetais, verduras e frutas devem ser bem cozidos e lavados; lavar utensílios domésticos, como facas e talheres, após serem utilizados para preparar alimentos como carnes e verduras; filtrar ou ferver a água; usar luvas para manusear o solo na jardinagem e higienizar as mãos após o contato com gatos ou seus respectivos dormitórios (Jones et al., 2001a).

Tentativas de imunizações prévias com a finalidade de prevenir a transmissão congênita de *T. gondii* em modelos murinos têm sido realizadas. Letscher-Bru e colaboradores (2003) avaliaram o efeito da vacinação de camundongos BALB/c e CBA/J com a proteína de superfície SAG1 de *T. gondii*, e verificaram uma taxa de transmissão fetal reduzida em mais de 50% em BALB/c por induzir uma imunidade protetora. A imunização dois meses antes da concepção com uma variedade de cepas de *Toxoplasma* também reduziu a taxa de transmissão fetal do parasito em ratos da linhagem Sprague-Dawley (Freyre et al., 2006). Inversamente, a infecção materna pela cepa ME49 do parasito, dentro de um mês antes da concepção, garantiu a proteção fetal contra a infecção por *T. gondii* em *Calomys callosus*, modelo experimental que tem se mostrado adequado para estudos da forma congênita da infecção (Barbosa et al., 2006; Ferro et al., 1999; Ferro et al., 2002).

### 1.5. Imunidade dos hospedeiros

A resposta imune do organismo hospedeiro contra *T. gondii* apresenta uma certa individualidade. Essa particularidade da imunidade contra a infecção pelo protozoário é própria da heterogeneidade genética do hospedeiro bem como do tipo de tecido em que o parasito se encontra. *T. gondii* é capaz de infectar uma variedade de células pertencentes a diferentes tecidos e estes, por sua vez, podem responder à infecção de maneiras diferentes, caracterizando a sua própria defesa (Fillisetti; Candolfi, 2004).

Fatoohi e colaboradores (2004) caracterizaram uma heterogeneidade das respostas imunes celular e humoral contra *Toxoplasma*. Frações antigênicas entre 21 e 49kD do parasito são as principais imunogênicas, induzindo uma forte resposta imune celular mediada por linfócitos TCD4<sup>+</sup>. As proteínas de grânulos densos, GRA-3 e GRA-7, e a proteína de superfície celular SAG1 possuem pesos moleculares no intervalo de 26 e 32kD (Cesbron-Delauw, 1994; Jacobs et al., 1999), enquanto que entre 32 e 39kD estão presentes GRA-6 e MIC-6 (Meissner et al., 2002). Portanto, essas proteínas podem ser potencialmente imunogênicas, o que não exclui a possibilidade de outras proteínas induzirem imunidade em diferentes indivíduos (Fatoohi et al., 2004).

A imunidade mediada por células é predominante durante a infecção pelo *T. gondii*, quando macrófagos, linfócitos T, células “natural killers” (NK) e leucócitos polimorfonucleares são funcionalmente ativos em hospedeiros imunocompetentes (Denkers; Gazzinelli, 1998).

A resposta imune inicial, que se estabelece assim que ocorre o contato do parasito com a célula hospedeira, é inespecífica, envolvendo a participação de macrófagos e células NK, além de outras células, inclusive de natureza não hematopoiética (Hauser et al., 1983).

Os macrófagos comportam-se como células apresentadoras de antígenos (APCs) e secretam citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral alfa

(TNF- $\alpha$ ) (Abbas; Lichtman, 2003; Hunter et al., 1995). Sua ativação por interferon gama (IFN- $\gamma$ ) induz suas atividades antiparasitárias que incluem mecanismos oxidativos, não oxidativos e indução da enzima degradante de triptofano: indoleamina 2,3 dioxygenase (IDO) (Ding et al., 1988; Hughes, 1988; Pfefferkorn et al., 1986). IL-12 também é secretada por células dendríticas e neutrófilos após infecção pelo *T. gondii*, o que garante o estabelecimento de uma imunidade inicial mediada por células tipo 1 (Gazzinelli et al., 1994).

Células NK secretam IFN- $\gamma$  e parece agir em sinergismo com os macrófagos (Hunter et al., 1994). Linfócitos T $\gamma$ - $\delta$  apresentam atividades citotóxicas *in vitro* contra o parasito e secretam IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  na presença de estímulos parasitários (Subauste et al., 1995). Estas células participam principalmente da imunidade inicial de mucosas no intestino, uma vez que a via oral de infecção humana é a mais comum, permitindo a essas células imunes o primeiro contato com o parasito (Lepage et al., 1998).

A imunidade de mucosas no controle de *T. gondii* é de crucial importância, à medida que as células epiteliais do intestino tornam-se infectadas pelo parasito (Kasper et al., 2004). A arquitetura epitelial do intestino comprometida e o influxo massivo de células inflamatórias para a lâmina própria podem causar necroses teciduais, sendo os linfócitos TCD4+ os mais envolvidos na promoção da destruição celular (Liesenfeld et al., 1996). Os enterócitos podem se comportar como APCs e secretar quimiocinas responsáveis pela atração de células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos (Perez de Lema et al., 2001), o que garante uma resposta imune. Entretanto, quando tal resposta não é controlada por citocinas imunomoduladoras derivadas de linfócitos intraepiteliais, pode-se observar imunopatologias graves (Kasper et al., 2004).

Uma vez estabelecida a resposta imune inicial inespecífica e o conseqüente processamento antigênico no interior das APCs, os linfócitos tornam-se ativados e passam a

secretar outras famílias de citocinas. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> diferenciam-se em duas subpopulações de distinto perfil de secreção de citocinas: Th1 e Th2. A subpopulação Th1 é predominante no curso da infecção pelo *Toxoplasma*.

Citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  são potencialmente inflamatórias e, portanto, secretadas por linfócitos TCD4<sup>+</sup> (Araújo, 1991). IFN- $\gamma$  possui inúmeras atividades biológicas, dentre elas a ativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos e células NK, a promoção da citotoxicidade de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, o aumento da expressão de moléculas de histocompatibilidade classe II e indução daIDO (McCabe et al., 1984). Além disso, IFN- $\gamma$  favorece a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, previne a ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reativação do parasito no hospedeiro (Bohne et al., 1993).

IL-2 atua no recrutamento de novos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e promove a ativação de células TCD8<sup>+</sup> ou células citolíticas, que produzem enzimas proteolíticas – granzimas e perforinas, capazes de romper a membrana de parasitos livres ou células infectadas pelo mesmo (Subauste et al., 1991).

TNF- $\alpha$  tem uma ação secundária pela ativação autócrina em macrófagos murinos e humanos infectados, melhorando suas atividades microbicidas por agir em sinergismo com IFN- $\gamma$  secretado de linfócitos e células NK (Sibley et al., 1991). Juntamente com IFN- $\gamma$  e LPS (lipopolissacarídeo), TNF- $\alpha$  controla a invasão, mas não a proliferação intracelular, de *T. gondii* na linhagem monocítica humana THP1 (Belloni et al., 2000); embora outros patógenos intracelulares, como *Plasmodium falciparum*, induzam TNF- $\alpha$  independentemente de IFN- $\gamma$  (Cruz Cubas et al., 1994).

Outras citocinas inflamatórias estão envolvidas na imunidade a *Toxoplasma* e também podem ser secretadas por células não pertencentes ao sistema imunológico. IL-6, além dos

macrófagos, também é derivada de células endoteliais, fibroblastos e até células neoplásicas. Ela é capaz de aumentar a atividade citotóxica de células NK e TCD8<sup>+</sup>, além de atuar na conversão de linfócitos B em células produtoras de anticorpos (Fillisetti; Candolfi, 2004).

IL-5 promove diferenciação e quimiotaxia de eosinófilos para o sítio de infecção, além de melhorar a capacidade de produção de IL-12. Alguns estudos apontam um papel imunopatogênico a IL-5 pela intensa necrose intestinal (Nickdel et al., 2001; Zhang; Denkers, 1999). IL-15 é secretada por várias células, incluindo macrófagos, e atua na maturação de células NK e atividade citolítica prolongada de linfócitos TCD8<sup>+</sup> (Khan; Kasper, 1996).

A resposta imune humoral a *T. gondii* tem um papel menor no controle da infecção e doença, apesar dos anticorpos serem parâmetros valiosos para técnicas de diagnóstico.

A classe de anticorpos IgM é a primeira a aparecer no decorrer da primeira semana de infecção pelo *Toxoplasma*. São excelentes aglutinadores e fixadores de proteínas do complemento (Fillisetti; Candolfi, 2004). Os anticorpos IgM são característicos de fase aguda ou recente, entretanto, podem permanecer detectáveis no soro humano por anos, se usadas técnicas de alta sensibilidade (Takahashi; Rossi, 1997). Anticorpos da classe IgA assumem particular importância no diagnóstico, principalmente em casos de IgM negativa no recém-nascido congenitamente infectado. Assim como IgM, IgA não atravessa a barreira placentária e, quando detectada no soro de recém-nascidos, é indicativo de resposta imune própria e não de origem materna (Pinon et al., 2001). Pesquisas indicam atuação da IgA na imunidade de mucosas, quando camundongos da linhagem OF-1 são imunizados por antígenos excretados/secretados (ESA) (Hafid et al., 2005).

Anticorpos IgG correspondem à segunda classe de imunoglobulinas a aparecerem na toxoplasmose. Suas funções incluem a citotoxicidade dependente de anticorpo, quando receptores para a porção Fc de IgG está presente na superfície celular de macrófagos e células NK, e a

atração do sistema complemento (Fillisetti; Candolfi, 2004). Esses anticorpos alcançam um título máximo e declinam gradualmente em alguns meses a anos (Ferro, 2000).

### **1.5.1. Mecanismos de imunomodulação e evasão do parasito**

Os efeitos da imunidade mediada por células contra a infecção pelo parasito são potencialmente graves se não houver um controle da resposta imune. Esse controle é realizado por diversas citocinas que são liberadas pelas próprias células do sistema imune ou por outros tipos celulares.

IL-10 é uma citocina imunomodulatória secretada por diversas células, incluindo macrófagos e linfócitos. Está intimamente ligada ao controle da resposta inflamatória na encefalite causada por *Toxoplasma* (Deckert-Schluter et al., 1997). Camundongos deficientes para IL-10 morrem ainda na fase aguda da infecção pelo infiltrado massivo de leucócitos e necrose tecidual do intestino delgado e fígado, conseqüentes da produção não controlada de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Suzuki et al., 2000). IL-10 inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e IL-2, por linfócitos T e células NK por interferirem na síntese de IL-12 nos macrófagos, conseqüentemente, inibindo as suas atividades efectoras (Sher et al., 1992).

O fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) é secretado por uma subpopulação linfocitária designada Th3, ou seja, células que possuem marcador para CD4 mas que não secretam IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 ou IL-10 (Mosmann; Sad, 1996). A citocina inibe a diferenciação e a proliferação de células T, além de alterar a expressão de receptores para TNF- $\alpha$  e moléculas co-estimulatórias nas superfícies celulares de macrófagos e linfócitos, como CD40-CD40L (Plum et al., 1995; Schmitt et al., 1994; Takeuchi et al., 1998). A principal via pela qual essa citocina afeta a resposta imune do hospedeiro envolve a participação de proteínas de cascata de sinalização no interior de macrófagos e linfócitos (Gorelik; Fravell, 2002; Kasper et al., 2004).

TGF- $\beta$  também regula a expressão do fator de transcrição T-bet que, na presença de uma infecção, é altamente expressado em linfócitos produtores de IFN- $\gamma$ . T-bet está envolvido na síntese de IFN- $\gamma$  por linfócitos (Neurath et al., 2002).

IL-4 é secretada por células T pertencentes a subpopulação Th2, assim como IL-10. É principalmente fator de ativação e diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos, principalmente IgE, envolvida na desgranulação de mastócitos e resposta contra helmintos (Abbas; Lichtman, 2003; Fillisetti; Candolfi, 2004). Acredita-se que possua função imunorregulatória por facilitar a passagem transplacentária de *T. gondii* (Alexander et al., 1998).

Simultaneamente ao equilíbrio da resposta imune provocado pelo próprio hospedeiro, no intuito de prevenir danos causados pela sua própria resposta inflamatória, existem evidências que apontam a participação dos patógenos na indução desse equilíbrio. Esse efeito paralelo traz benefícios para o patógeno, que propicia um meio ambiente menos tóxico para sua sobrevivência, e para o hospedeiro, que não desenvolve uma resposta imune exacerbada danosa (Aliberti; Bafica, 2005).

*T. gondii* interfere na produção de citocinas inflamatórias por diferentes vias. O parasito é capaz de inibir a fosforilação de p65/RelA, proteína que participa da cascata de sinalização envolvida na habilidade de translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo. Frente a esta situação, os macrófagos e células dendríticas diminuem a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  em resposta aos antígenos parasitários (Shapira et al., 2005). Butcher e colaboradores (2005) demonstraram que a infecção pelo parasito induz a fosforilação de STAT-3, fator de transcrição ativado por IL-10, envolvido na regulação de genes supressores de citocinas inflamatórias.

A maior expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) classe II induzida por IFN- $\gamma$  pode ser alterada na presença de *Toxoplasma* em APCs profissionais (Lüder

et al., 2001). Na medida que isso ocorre, os linfócitos T antígeno-específicos tornam-se temporariamente inativos pela frequência reduzida da apresentação de antígenos pelas APCs. A inibição da expressão de MHC classe II por *T. gondii* se dá apenas em células infectadas e de forma independente de IL-10 e TGF- $\beta$ , segundo Lüder e colaboradores (1998). O bloqueio da expressão de MHC classe II pode estar intimamente relacionado ao transporte inadequado de STAT-1 do citosol para o núcleo, quando a ligação específica desse fator de transcrição aos sítios ativados por gama (GAS) no DNA é reduzida (Lang et al., 2006).

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  é controlada em células infectadas. *T. gondii* controla a expressão e produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fundamental para posterior síntese de NO (Lüder et al., 2003). Rozenfeld e colaboradores (2005) relataram um aumento na produção de TGF- $\beta$  e uma diminuição na síntese de NO em micróglia infectadas por *T. gondii* de camundongos BALB/c. O mecanismo imunomodulador gatilhado pelo TGF- $\beta$  impediu danos neurológicos durante a toxoplasmose cerebral desses camundongos e propiciou a sobrevivência do parasito. Enquanto que uma menor produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) foi identificada em macrófagos murinos infectados por *T. gondii* (Shrestha et al., 2006).

A infecção de macrófagos murinos, da linhagem RAW 264.7, por parasitos viáveis de *T. gondii* resultou na inibição da fosforilação de STAT-1, da secreção de NO e da expressão de genes da família das GTPases, recentemente designados como prejudiciais à sobrevivência parasitária. Essas interferências são conseqüências da ativação de SOCS (proteínas supressoras da sinalização de citocinas) pelo parasito, principalmente SOCS-1 (Zimmermann et al., 2006). SOCS-1 inibem as JAKs, proteínas kinases ligadas aos receptores para IFN- $\gamma$  na superfície de macrófagos, impedindo a fosforilação de STAT-1 que, por sua vez, fica

incapacitada de migrar para o núcleo e assim ativar genes responsáveis pela destruição do parasito (Alexander; Hilton, 2004). *T. gondii* também pode interferir na expressão de receptores para TNF- $\alpha$  na linhagem monocítica humana THP-1, apresentando efeitos contraditórios, uma vez que diminui os receptores de superfície celular (TNFR1) e aumenta os receptores solúveis no citosol (Derouich-Guergour et al., 2002).

Lipoxinas são eicosanóides endógenos que apresentam propriedades anti-inflamatórias quando ligadas a dois diferentes receptores: LXAR/FPRL-1 acoplado a proteína G no citosol; e AhR, acoplado ao núcleo (Schaldach et al., 1999). Podem apresentar atividade imunomoduladora associada às SOCS (Leonard et al., 2002). A síntese de lipoxina A<sub>4</sub> é dependente da enzima 5-lipoxygenase, que está presente na forma inativa no citoplasma de macrófagos, plaquetas, células dendríticas e neutrófilos. Consistente com isso, camundongos deficientes para 5-lipoxygenase morrem na fase crônica da infecção pelo excesso de células inflamatórias ativas (Aliberti et al., 2002).

A produção de lipoxinas nas células hospedeiras faz parte das estratégias de evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro. A enzima 5-lipoxygenase age no ácido aracdônico resultando na formação de leucotrieno A<sub>4</sub> que, por intermédio de uma segunda enzima denominada 15-lipoxygenase, é convertido em lipoxina A<sub>4</sub>. Bannenberg e colaboradores (2004) identificaram uma atividade enzimática em taquizoítas expostos a ácido aracdônico, cujos peptídios apresentaram homologia a lipoxygenases derivadas de plantas. Provavelmente, o parasito contribui na produção de lipoxinas na célula hospedeira, prevenindo uma resposta inflamatória não controlada.

Finalmente, a apoptose, ou morte celular programada, é controlada na presença de *T. gondii*. Entretanto, o parasito tem efeitos contraditórios na apoptose, pois ora ativa ou ora inibe a morte das células. As condições exatas para esse duplo efeito vão depender da presença ou

ausência de parasitos intracelulares, da natureza celular em questão, da virulência do parasito e da susceptibilidade do hospedeiro (Lang et al., 2006). A apoptose de diferentes populações leucocitárias, incluindo linfócitos T e B, células NK e macrófagos, é significativamente aumentada no curso da toxoplasmose (Hisaeda et al., 1997). Ao mesmo tempo em que promove a apoptose de células inflamatórias, o parasito impede a morte de células infectadas para evitar resposta inflamatória local. Nesse propósito, o nível de citocromo c no citosol da célula infectada é reduzido, impedindo a cascata de sinalização dependente de caspases no interior da mitocôndria (Lang et al., 2006).

### **1.6. Imunologia da gestação**

Durante a gestação, o sistema imune materno normalmente apresenta um estado de tolerância frente aos antígenos fetais. Após anos considerando a gestação como um estado imune de supressão, muitos estudos dão preferência ao termo “tolerância”, já que a resposta imune periférica da mãe contra agentes infecciosos permanece eficaz durante a gestação (Zenclussen, 2006).

O balanço de citocinas de perfis Th1 / Th2, com uma predominância do tipo Th2, é o mecanismo mais relevante na manutenção e sucesso gestacionais (Saito, 2000). Nesse sentido, vários aspectos da imunologia da reprodução enfatizam a presença concomitante de gestação e patógenos intracelulares indutores de resposta Th1, como *T. gondii*.

A produção de citocinas placentárias, juntamente com aquelas derivadas da população leucocitária presente no microambiente placentário, agem sinergicamente no estabelecimento da gravidez (Mouzon; Guerre-Millo, 2006). Inúmeras funções são atribuídas às citocinas durante a gestação. Elas participam da manutenção do corpo lúteo, adesão e implantação do blastocisto no

endométrio, desenvolvimento placentário e fetal, diferenciações celulares e medeiam mecanismos imunes tolerantes ao conceito (Schäfer-Somi, 2003).

Uma gestação normal é caracterizada por um estado imunológico preferencialmente Th2, quando citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  são produzidas por diferentes células, inclusive de natureza fetal. Qualquer disfunção desse status imunológico pode potencializar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , altamente prejudiciais à gestação (Luppi, 2003; Raghupathy, 2001; Tangri; Raghupathy, 1993). Segundo Lin e colaboradores (1993), IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 são sintetizadas na interface materno-fetal murina, principalmente por células da decídua e da placenta fetal em todo o período gestacional. Interessantemente, alguns hormônios produzidos durante a gestação podem agir na indução de citocinas anti-inflamatórias. Szekeres-Bartho; Chaouat (1990) demonstraram que a progesterona capacita os linfócitos de fêmeas prenhes murinas a secretarem o fator de bloqueio induzido por progesterona (PIBF), que inibe a atividade de células NK *in vitro*. A prostaglandina E2 (PGE2) tem a habilidade de inibir a produção de IL-2 por linfócitos T e a atividade citotóxica de células NK; enquanto que hormônios glucocorticóides aumentam a produção de IL-4 (Daynes; Aranco, 1989; Kelly; Critchley, 1997). PGE2 induz um perfil anti-inflamatório, mas não exclui sua participação no processo de sinalização para o parto, ao agir em sinergismo com citocinas inflamatórias e ciclo-oxygenase (COX<sub>2</sub>) (Yan et al., 2002).

Dudley e colaboradores (1993) identificaram um declínio na produção de IL-2 concomitante a um aumento de IL-4 e IL-6 durante a gestação murina. Paralelamente, há maior expressão e produção de IL-10 em mulheres gestantes (Hanna et al., 2000). A administração de IL-10 é capaz de reverter as perdas fetais normalmente observadas no modelo murino de

cruzamento CBAxDBA/2, cujo aborto espontâneo é causado por citocinas Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-2, altamente reguladas durante a gestação desses animais (Tangri; Raghupathy, 1993).

Esses estudos sugerem que as citocinas Th2, particularmente IL-10, têm funções essenciais na manutenção de uma gestação normal. O principal papel de IL-10 está em controlar a produção de citocinas e quimiocinas derivadas de linfócitos T, macrófagos e células NK, o que impede temporariamente os mecanismos citotóxicos desencadeados por essas células (Wall et al., 1991). No entanto, no que se refere às células NK uterinas, IL-10 não consegue inibir a produção de IFN- $\gamma$  por essas células (Vigano et al., 2001). A interrupção de secreção de IL-12 por macrófagos ativados pode indiretamente interferir com a produção de IFN- $\gamma$ . Essa situação revela que IL-10 pode influenciar na produção de IFN- $\gamma$  por células NK uterinas de uma maneira indireta, ao impedir a expressão de citocinas ativadoras de células produtoras de IFN- $\gamma$ .

TGF- $\beta$  também é uma citocina importante no estabelecimento da gravidez, por propiciar uma estratégia anti-rejeição do feto semi-alógeno. Suas ações incluem inibição de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias e a atividade citotóxica de células NK (Raghupathy, 2001). Entretanto, TGF- $\beta$  e activinas, membros pertencentes a superfamília de TGF- $\beta$ s, estão também envolvidos na preparação do endométrio para a implantação. Secretadas pelos epitélios da tuba uterina e do endométrio, essas citocinas participam da comunicação materno-fetal durante o estabelecimento da gravidez (Jones et al., 2006). As activinas  $\beta$ A estão principalmente envolvidas com a decidualização, processo de formação da placenta, através da regulação de metaloproteínas ou pela estimulação de componentes específicos da decídua, como fibronectina (Alexander et al., 1996; Caniggia et al., 1997).

O estabelecimento de uma gestação é, portanto, caracterizado por uma predominância de citocinas anti-inflamatórias, que garante um sucesso gestacional. Nesse propósito, a decídua e os

tecidos placentários têm a capacidade de expressar e produzir muitas dessas citocinas em conjunto com a população leucocitária local. Mas a presença de citocinas Th2 na interface materno-fetal não exclui a produção de citocinas pró-inflamatórias nesse local. Um exemplo dessa situação é a expressão de IFNs, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em células trofoblásticas no primeiro trimestre de gestação (Bowen et al., 2002) que, caso não seja controlada, pode prejudicar a gestação, inclusive interrompendo-a. Isso se dá pela ativação de macrófagos uterinos que, ao liberarem TNF- $\alpha$ , estimulam os linfócitos a causarem apoptose de células trofoblásticas (Drake; Head, 1989). Apesar da atividade de macrófagos atuar contrariamente à gestação, estas células são, ao mesmo tempo, fundamentais para seu curso normal, uma vez que atuam na remoção de células trofoblásticas apoptóticas (Abrahams et al., 2004). Dessa maneira, os macrófagos residuais uterinos previnem a liberação de antígenos fetais, que poderiam estimular uma resposta inflamatória prejudicial à sobrevivência do embrião.

Segundo Chaouat e colaboradores (1990), a administração de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  em fêmeas de camundongos prenhes ocasionam altas taxas de abortos nesses animais. Hill e colaboradores (1995) verificaram alta produção de citocinas Th1 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de mulheres que já sofreram abortos espontâneos, quando a atividade embriotóxica foi identificada em 66% das mulheres com histórias de abortos de etiologia desconhecida. Maior detecção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi observada em PBMC estimuladas por LPS e fitohemaglutinina (PHA) de mulheres que já sofreram abortos; enquanto que a produção de IL-6 e TGF- $\beta$  permaneceu semelhante à de mulheres gestantes normais (Daher et al., 2004). Além disso, muitos abortos espontâneos estão intimamente relacionados à preeclampsia, que se caracteriza por uma deficiência no remodelamento fisiológico das artérias espiraladas uterinas causando hipóxia em certas regiões da placenta. Essa queda de oxigênio pode direcionar a

produção de fatores citotóxicos, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , citocinas sabidamente prejudiciais ao sucesso gestacional. A liberação dessas citocinas nessas áreas de baixa concentração de oxigênio pode estar ligada às próprias células placentárias ou outras fontes celulares (Benyo et al., 2001).

Svensson e colaboradores (2001) não determinaram distúrbios gestacionais em camundongos deficientes para IL-4 / IL-10, sugerindo que as células Th2 não são exclusivas na manutenção da gestação.

Células T regulatórias (Treg) mostraram capacitadas no controle de células Th1. Seu nível durante a gestação é aumentado em 100% quando comparado ao nível de não gestantes e, de 6 a 8 semanas após o nascimento, a população celular volta ao estado basal (Somerset et al., 2004). No entanto, Treg não influenciam na expressão de IL-4 e IL-10, possibilitando a existência de outros mecanismos de proteção existentes (Zenclussen, 2006). A ativação dessas células ocorre principalmente no timo, pois os antígenos fetais podem cair na circulação materna e migrar para esse órgão linfóide, onde são processados por APCs em circunstâncias não inflamatórias, o que provocaria a expansão clonal de células Treg (Zenclussen, 2006).

### **1.6.1. Placenta humana**

A placenta é um órgão altamente especializado e sua formação é um processo altamente coordenado pela interação celular materna e fetal (Gude et al., 2004).

As diferentes ordens de mamíferos possuem morfologias placentárias distintas, o que influencia significativamente na proximidade do tecido fetal ao sangue materno. Existem quatro diferentes tipos de placentas: epitéliocorial, sinoepitéliocorial, endotéliocorial e hemocorial. A epitéliocorial, presente em suínos e cavalos, é caracterizada pelo contato do cório ao epitélio endometrial intacto. Na sinoepitéliocorial, presente em ruminantes, o epitélio uterino é removido e o cório tem contato direto ao tecido conjuntivo endometrial. Já na endotéliocorial, presente nos carnívoros, a mucosa endometrial é removida e o cório alcança o endotélio materno.

Finalmente, a hemocorial, presente em humanos, primatas e roedores, é caracterizada por remoção total do tecido endometrial e o cório é banhado pelo sangue materno extravasado (Gude et al., 2004).

A formação da placenta hemocorial humana caracteriza-se por um elaborado processo fisiológico específico para tornar o endométrio receptivo ao conceito, como a secreção de hormônios, citocinas e moléculas de adesão. Previamente à formação da placenta, o trofoblasto, camada celular externa ao blastocisto, sofre mudanças morfo-fisiológicas que se iniciam com a perda da zona pelúcida. Desprovido de zona pelúcida, o trofoblasto é agora hábil para aderir ao endométrio. Imediatamente após a adesão, o trofoblasto diferencia-se em citotrofoblasto e uma massa multinuclear, sinciotrofoblasto, que se estende e invade a mucosa uterina até alcançar o sangue materno. Estabelecido esse contato do trofoblasto com o sangue materno, os tecidos fetais estão intimamente expostos ao sistema imunológico materno (Aplin, 2000). No entanto, o sangue fetal é contido no interior de vasos sanguíneos, não entrando em contato direto com o sangue materno. Essa situação reflete a proteção do feto contra possíveis transmissões de patógenos ou toxinas oriundos da mãe, contudo, permissivo à passagem de nutrientes, oxigênio e anticorpos maternos. Essa barreira placentária é formada por quatro camadas: sinciotrofoblasto, citotrofoblasto, tecido conjuntivo e células endoteliais dos vasos fetais (Gude et al., 2004).

A estrutura da placenta humana inclui as porções materna e fetal constituídas pela decídua e placa coriônica, respectivamente. As células decíduais são derivadas de fibroblastos, que se diferenciam e formam a decídua. Uma matriz rica em laminina, colágeno IV e fibronectina é produzida por essas células, que também secretam várias citocinas, fatores de crescimento e agentes imunomoduladores envolvidos na regulação da invasão do trofoblasto (Jones et al., 2006). Dentre as citocinas derivadas das células decíduais, a IL-15 está relacionada ao

recrutamento de células NK e macrófagos para o microambiente placentário. Neste local, estas células adquirem fenótipo diferenciado da população celular encontrada na periferia do organismo (Verma et al., 2000).

A placa coriônica é formada pelos vilos coriônicos, que formam a própria barreira placentária, e se distribuem em inúmeras ramificações para aumentar seu contato com o sangue materno. A população de células trofoblásticas corresponde à primeira camada celular dos vilos, sendo, portanto, banhada diretamente e continuamente pelo sangue da mãe, o que garante uma exposição direta dessas células ao seu sistema imune (Gude et al., 2004). Essa exposição pode levar a uma rejeição materna ao conceito, uma vez que o trofoblasto é uma célula de origem fetal que expressa ambas proteínas de origem materna e paterna; entretanto o trofoblasto apresenta características únicas que torna as células imunes maternas tolerantes a sua presença.

### **1.6.2. Células trofoblásticas**

O trofoblasto apresenta diferentes funções. É responsável pela aderência do blastocisto ao endométrio receptivo; pela nutrição do embrião, ao fagocitar os elementos sanguíneos maternos; e por formar a porção fetal da placenta (Ferro, 2000). Além dessas competências, o trofoblasto mostra características que possibilitam a sua sobrevivência no organismo materno, na medida em que deixa de expressar algumas proteínas de superfície, como MHC classe II, e torna-se capaz de expressar e produzir citocinas cruciais para o sucesso gestacional.

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) codifica um grupo de moléculas que são expressas na superfície de quase todas as células nucleadas do corpo. Essas moléculas são divididas em duas categorias, MHC classe I e classe II, cujas finalidades estão na apresentação de antígenos próprios ou não próprios aos linfócitos T. As moléculas MHC classe I estão dentro de dois principais grupos: clássicos (Ia) e não clássicos (Ib) (Abbas; Lichtman,

2003). O trofoblasto humano expressa apenas MHC classe Ib, codificado pelos loci HLA-E e HLA-G, o que torna essas células resistentes à rejeição pelas células NK e linfócitos T citolíticos (King et al., 2000). Paralelamente, células NK modificam o seu padrão de secreção de citocinas quando presentes na interface materno-fetal. Em contato com células JEG-3, uma linhagem celular trofobástica humana, a proporção de células NK secretoras de TNF- $\alpha$  diminui consideravelmente, mostrando a existência de um padrão de comunicação que se estabelece entre mãe e feto para prevenir a rejeição do conceito (Ntrivalas et al., 2006).

A ausência de moléculas MHC classe II e classe I (Ia) permite que o trofoblasto humano não seja reconhecido pelo sistema imune materno, apesar de estar em íntimo contato com o sangue da mãe (Entrican, 2002). O silenciamento da expressão do transativador classe II (CIITA) é responsável pela ausência de MHC classe II no trofoblasto humano, pois é um fator essencial para a transcrição do gene dessa molécula (Van Den Elsen et al., 2000). Células trofoblásticas de mulheres que já sofreram abortos espontâneos expressam MHC classe II (Labarrere; Faulk, 1990), o que permite a apresentação de antígenos paternos às células imunes maternas, que passam a reagir contra esses antígenos, causando respostas inflamatórias prejudiciais à gestação.

Outras estratégias são usadas pelos trofoblastos para impedir a rejeição materna. O trofoblasto é capaz de inibir a ativação do sistema complemento a partir do uso de proteínas reguladoras; induz apoptose de células T maternas através da ligação de FasL, expressa na superfície do trofoblasto, ao Fas dos linfócitos maternos; e potencia a produção de citocinas anti-inflamatórias (Bowen et al., 2002; Guller et al., 1998; Wegmann et al., 1993).

As células trofoblásticas humanas produzem IL-10, TGF- $\beta$ , fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), TNF- $\alpha$ , IFNs, IL-1 e IL-6 (Entrican, 2002). No entanto, as células deciduais, amnióticas e endoteliais (materna e fetal) também produzem

citocinas que auxiliam na manutenção de gravidez, como IL-10 e IL-4 (Moraes-Pinto et al., 1997; Trautman et al., 1997). A principal fonte dessas citocinas é o trofoblasto, o que não exclui a sua secreção por macrófagos e linfócitos residentes do microambiente placentário (Simon et al., 1994; Steinborn et al., 1998; Vince et al., 1992). Em contrapartida, as citocinas Th1 não são completamente prejudiciais à gestação, já que regulam a capacidade invasiva do trofoblasto, auxiliam na manutenção da decídua e atuam na modificação das artérias espiraladas, permitindo maior fluxo sanguíneo na direção do embrião (Ashkar et al., 2000), porém, quando não controlada a sua produção, são potencialmente adversas ao sucesso gestacional.

Merecido destaque foi preferencialmente direcionado a IL-10, pela sua capacidade de interferir na apresentação antigênica, na atividade citotóxica de células TCD8<sup>+</sup> e NK e na produção de citocinas Th1 (Fiorentino et al., 1991). A expressão e produção de IL-10 foram visualizadas em células trofoblásticas humanas (Hanna et al., 2000; Roth et al., 1996), apesar Trautman e colaboradores (1997) terem observado apenas pequenas quantidades da citocina em células amnióticas e dos vilos coriônicos.

Citotrofoblastos de primeiro e segundo trimestres gestacionais apresentam alta produção de IL-10 e seu receptor e baixa concentração de IL-4 (Hanna et al., 2000), enquanto que apenas IL-4 foi identificada nessas células segundo Sacks e colaboradores (2001). Esses dados divergentes levam em consideração a produção de IL-10 por indução de fatores locais, como endotoxinas derivadas de macrófagos, ou por outras células do microambiente placentário (Roth et al., 1996; Sacks et al., 2001). No fim da gestação, há um declínio de IL-10, mas seu receptor permanece viável na superfície celular do trofoblasto, demonstrando que a diminuição da IL-10 no último período da gravidez é um fenômeno fisiológico independente da expressão de seu receptor (Hanna et al., 2000). Essa queda de IL-10 pode ser o sinal inicial de um sistema regulatório necessário para garantir a ativação de mecanismos pró-inflamatórios envolvidos no

parto, como IFN- $\gamma$ , que se apresentou em altos níveis em trofoblastos de placentas a termo (Hanna et al., 2000).

O nascimento pré-maturo está muitas vezes associado à presença de citocinas pró-inflamatórias e à ausência de IL-10. A expressão de ciclo-oxygenases em placentas pré-maturas é alta quando comparada a placentas de primeiro e segundo trimestres. Exógenos de IL-10 são capazes de reverter esse quadro, ao inibir a ciclo-oxygenase (Hanna et al., 2006). Esses dados ressaltam o papel da IL-10 na manutenção da gestação.

Como já mencionado anteriormente, a placenta humana produz outras citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$ . Seu papel imunossupressor é logo efetivado, na medida que o sêmen de roedores e humanos contém essa citocina, contribuindo assim para o início da tolerância materna ao feto (Robertson et al., 2002). Durante a invasão da decídua, células B maternas secretam TGF- $\beta$ , que bloqueiam a resposta de linfócitos T citotóxicos contra o trofoblasto humano (Clark et al., 1994). No entanto, poucos estudos revelaram o seu envolvimento com a interface materno-fetal.

### **1.6.3. Células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo)**

O trofoblasto humano é a principal célula comprometida com os mecanismos que levam a um sucesso gestacional, ao impedir a rejeição materna através de diferentes estratégias estabelecidas. Para melhor entender seu papel na imunologia da gestação e, especialmente, na presença de parasitos intracelulares, como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando-se de linhagens celulares pré-estabelecidas.

Células BeWo foram isoladas de um coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey. São células formadoras de monocamadas e que não se diferenciam em sincício. Em cultura, secretam uma matriz rica em laminina 10 (Church; Aplin, 1998), além de citocinas como

IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 (Bennett et al., 1997; Fujisawa et al., 2000; Moraes-Pinto et al., 1997). Estudos da capacidade invasiva de células trofoblásticas humanas podem ser realizados usando células BeWo, pois foi observado que fatores solúveis de PBMC de mulheres gestantes propiciaram uma melhor migração de células BeWo, sugerindo uma sinalização molecular entre mãe e embrião que facilite a implantação do blastocisto no endométrio receptivo (Egawa et al., 2002).

Essas células de coriocarcinoma apresentam propriedades morfológicas e marcadores bioquímicos comuns ao trofoblasto humano (Van der Ende et al., 1990). Apesar de estar em cultura há quase quarenta anos, as células BeWo ainda contêm a habilidade de secretar grandes quantidades de gonadotrofina coriônica humana (HCG) e hormônio lactogênio placentário, elementos potencialmente produzidos pela placenta humana normal (Pattillo et al., 1979).

*T. gondii* é capaz de infectar células trofoblásticas humanas facilmente (Abbasi et al., 2003), o que se tornaria uma porta de entrada para o parasito atingir os tecidos fetais. Nesse propósito, células BeWo mostram-se como excelente modelo de estudo *in vitro* da toxoplasmose congênita bem como de outras infecções. A infecção por *Chlamydomphila abortus* nessa linhagem celular não é controlada mesmo sob tratamento com IFN- $\gamma$ , citocina altamente inflamatória envolvida no combate a microorganismos patogênicos (Entrican et al., 2002). Esse padrão de resposta não é comum, o que sugere um mecanismo imunológico diferente na interface materno-fetal. Entrican e colaboradores (2002) também demonstraram que células BeWo não expressamIDO e não produzem IFN- $\gamma$  biologicamente ativo, apesar de apresentarem receptores para a citocina.

Os monócitos são as principais células da corrente sanguínea responsáveis pela disseminação de *T. gondii* pelo organismo hospedeiro (Channon et al., 2000). Como o parasito é capaz de se ligar a ICAM-I através de suas proteínas de micronemas (Barragan et al., 2005), a passagem de *T. gondii* para os tecidos adjacentes é facilitada, uma vez que as células endoteliais expressam grandes quantidades de ICAM-I. De acordo com isso, Pfaff e colaboradores (2005a) identificaram a expressão de ICAM-I em células BeWo estimuladas com sobrenadantes de cultura de PBMCs infectadas por *T. gondii* ou com exógenos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A expressão dessa molécula nessas células trofoblásticas aumentou significativamente a adesão de monócitos da linhagem THP-1 humana, numa condição *in vitro*. Portanto, numa condição *in vivo*, as citocinas inflamatórias secretadas durante a infecção pelo *Toxoplasma* podem influenciar na adesão de células sanguíneas ao trofoblasto humano, via ICAM-I, facilitando a passagem transplacentária do parasito.

Outros estudos realizados por Pfaff e colaboradores (2005b) verificaram que células BeWo apresentam-se refratárias a estímulos inflamatórias. Mesmo na presença de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , essas células não conseguiram controlar a proliferação parasitária de *T. gondii*. Simultaneamente, células BeWo mostraram baixa disponibilidade de poliaminas, que são necessárias para o crescimento parasitário, o que explica o fato da replicação de *T. gondii* ser reduzida nessas células em relação ao fibroblasto humano infectado. Essa situação reflete a possível competição estabelecida entre NOS e arginase pela utilização do mesmo substrato, L-arginina, para a formação de NO e poliaminas, respectivamente.

A habilidade de *T. gondii* em invadir e crescer em células BeWo permanece inalterada na presença de IFN- $\gamma$  e L-triptofano, o que evidencia uma maior susceptibilidade das células ao parasito. Entretanto, células epiteliais do cérvix uterino humano (linhagem HeLa)

controlam a infecção na presença de IFN- $\gamma$ . Esse fenômeno é decorrente da ausência da atividade enzimática da IDO em células BeWo. Em células HeLa, o controle parasitário opera pela ação de IFN- $\gamma$  sobre a IDO, que degrada o triptofano necessário para a proliferação do parasito (Oliveira et al., 2006).

Todos esses dados reforçam a idéia de que o trofoblasto humano estabelece uma estratégia particular que impede o seu reconhecimento pelas células imunes maternas, mesmo na presença de agentes infecciosos. Dessa maneira, ao mesmo tempo em que o trofoblasto agiria na prevenção da rejeição fetal, essa célula estaria deixando o embrião mais susceptível à infecção. Poucos estudos envolvendo a imunologia da gestação e as células trofoblásticas frente a uma infecção, como por *T. gondii*, estão dispostos na literatura. Assim, torna-se importante compreender os mecanismos imunológicos existentes na interface materno-fetal na presença de *T. gondii*, o que possibilitaria um melhor entendimento da intrincada rede de citocinas ali estabelecidas e, conseqüentemente, os fatores de risco associados à transmissão congênita do parasito.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a linhagem BeWo é constituída por células humanas derivadas de coriocarcinoma e que apresentam propriedades morfológicas e bioquímicas semelhantes às células trofoblásticas humanas, a realização deste trabalho se justifica pela possibilidade de se implantar um modelo *in vitro* de investigação do papel das citocinas típicas de uma resposta Th2 no processo de imunomodulação materna frente a infecção por *T. gondii*. Dessa forma, novos dados podem ser adicionados no entendimento da rede de citocinas envolvidas na gestação concomitante à infecção congênita por *T. gondii*, parasito de significativa importância do ponto de vista da saúde pública.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Levando em consideração células BeWo, que se comportam de uma maneira semelhante ao trofoblasto humano, e a sua susceptibilidade a *T. gondii*, o presente trabalho teve como objetivo verificar se essa susceptibilidade ao *Toxoplasma* está relacionada à produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), normalmente expressadas pelo trofoblasto humano no período gestacional.

#### 3.2. Objetivos específicos

Utilizando cultura de células trofoblásticas provenientes de coriocarcinoma humano, o trabalho teve como objetivos:

- Determinar a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 em células BeWo infectadas ou não por *T. gondii*;
- Verificar a susceptibilidade de células BeWo infectadas por *T. gondii* frente a administração exógena de IL-10 ou TGF- $\beta$ 1;
- Verificar a susceptibilidade de células BeWo infectadas por *T. gondii* frente a administração exógena de IL-10 ou TGF- $\beta$ 1 seguida de tratamento com IFN- $\gamma$ ;
- Verificar a susceptibilidade de células BeWo infectadas por *T. gondii* submetidas a administração exógena de anticorpos direcionados contra IL-10 ou TGF- $\beta$ , na presença ou ausência da administração subsequente de IFN- $\gamma$ .

Células HeLa (células epiteliais do cérvix uterino humano) foram utilizadas como padrão de controle para a análise dos procedimentos aqui objetivados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cultura de células BeWo e HeLa

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

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> (Ciencor Scientific, Brasil) contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Chemical CO., Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Brasil) e 1% de antibióticos (10,000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Cultilab, Brasil), L-glutamina, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e 2β-mercaptoetanol (Sigma Chemical CO., Brasil) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com Oliveira (2005).

O repique das células foi realizado a cada três dias e procedeu-se, brevemente, da seguinte maneira: novo meio de cultura foi adicionado aos frascos e, com auxílio de “cells scrapers” (Ciencor Scientific, Brasil), as células foram retiradas, transferidas para tubos de 15ml e centrifugadas a 1500rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o “pellet” foi ressuspenso em 1ml de meio com soro e distribuído em dois novos frascos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento (90% de meio de cultura a 10% de SBF e 10% de DMSO).

## **4.2. Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii***

### **4.2.1. Manutenção *in vivo***

A cepa RH de *T. gondii* foi mantida na cavidade peritoneal de camundongos Swiss do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia.

O repique foi realizado a cada dois dias e procedeu-se da seguinte maneira: a cavidade peritoneal dos camundongos infectados foi lavada com meio de cultura RPMI 1640 e o exsudato peritoneal desses camundongos foi inoculado em camundongos não infectados.

### **4.2.2. Manutenção *in vitro***

Parasitas retirados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss foi contado em câmara de Neubauer e adicionado em alguns frascos de cultura contendo células BeWo e HeLa, com a finalidade de manter *in vitro* células infectadas por *T. gondii*.

Na medida em que a grande maioria das células infectadas em cultura encontrava-se destruída pelo parasito, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi passado para um tubo de 15ml, com a ajuda de seringas (5ml) e agulhas (25x7), centrifugado e o “pellet” foi ressuspenso em meio e distribuído em dois frascos contendo células não infectadas.

## **4.3. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura para IL-10 e TGF- $\beta$ 1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii***

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan (Sigma Chemical CO., Brasil). Após o ajuste para uma concentração de  $5 \times 10^5$  cél/ml, as mesmas foram transferidas para uma placa de 24 orifícios (Ciencor Scientific, Brasil) e cultivadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram adicionados à placa

numa proporção de cinco parasitos por célula (5:1). Após três horas de interação, as células foram lavadas com meio a 10% de SBF para retirar os parasitos não aderentes e permaneceram por mais 24 horas nas mesmas condições de cultura. O mesmo procedimento foi realizado sem a presença de taquizoítas de *T. gondii* (controle). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para posterior análise de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1) por meio do Teste Imunoenzimático ELISA Captura.

#### **4.4. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por *T. gondii* e tratadas com IL-10 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos**

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan. Após o ajuste para uma concentração de  $1 \times 10^5$  células a cada 200 $\mu$ l de meio, as mesmas foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13mm (Ciencor Scientific, Brasil) e permaneceram por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas com células aderidas foram lavadas e receberam 200 $\mu$ l de meio contendo rIL-10 humana (Pepro Tech Inc., RockyHill, USA) numa concentração de 50ng/ml. Após 24 horas, parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram adicionados na proporção 5:1, por três horas, e as células novamente tratadas com rIL-10 humana (50ng/ml) ou rIL-10 (50ng/ml) mais rIFN- $\gamma$  humano (PharMingen, Califórnia, USA) a 200ng/ml. O mesmo procedimento foi realizado sem a presença de citocinas (controle) ou apenas com rIFN- $\gamma$  humano. Em seguida, as células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixadas em formol (Vetec, Brasil) a

10% em PBS por duas horas e coradas com azul de toluidina (Sigma Chemical CO., Brasil) por 30 segundos. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e as células quantificadas quanto ao número médio de parasitos intracelulares a cada 100 células infectadas examinadas (proliferação intracelular) e quanto à porcentagem de células infectadas a cada 100 células examinadas (índice de infecção).

#### **4.5. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por *T. gondii* e tratadas com anti-IL-10 e IFN- $\gamma$ recombinante humano**

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan. Após o ajuste para uma concentração de  $1 \times 10^5$  células a cada 200 $\mu$ l de meio, as mesmas foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13mm e permaneceram por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas contendo células aderidas foram lavadas e receberam 200 $\mu$ l de meio contendo anticorpo monoclonal humano produzido em camundongo contra IL-10 (R&D Systems, Clone 23738.111, Minneapolis, MN) numa concentração de 10000ng/ml. Após 24 horas, parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram adicionados na proporção 5:1 (3 horas) e as células novamente tratadas com anti-IL-10 humana (10000ng/ml) ou anti-IL-10 (10000ng/ml) mais rIFN- $\gamma$  humano a 200ng/ml. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, fixadas em formol 10% em PBS por duas horas e coradas com azul de toluidina por 30 segundos. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e as células avaliadas quanto ao número médio de parasitos intracelulares a cada 100 células infectadas examinadas (proliferação intracelular) e quanto à porcentagem de células infectadas a cada 100 células examinadas (índice de infecção).

#### **4.6. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por *T. gondii* e tratadas com TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos**

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan. Após o ajuste para uma concentração de  $1 \times 10^5$  células a cada 200 $\mu$ l de meio, as mesmas foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13mm e permaneceram por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas contendo células aderidas foram lavadas e receberam 200 $\mu$ l de meio contendo rTGF- $\beta$ 1 humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) numa concentração de 50ng/ml. Após 24 horas, parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram adicionados na proporção 5:1 (3 horas) e as células novamente tratadas com rTGF- $\beta$ 1 humano (50ng/ml) ou rTGF- $\beta$ 1 (50ng/ml) mais rIFN- $\gamma$  humano a 200ng/ml. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, fixadas em formol 10% em PBS por duas horas e coradas com azul de toluidina por 30 segundos. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e as células quantificadas quanto ao número médio de parasitos intracelulares a cada 100 células infectadas examinadas (proliferação intracelular) e quanto à porcentagem de células infectadas a cada 100 células examinadas (índice de infecção).

#### **4.7. Análise da proliferação intracelular e índice de infecção em células BeWo e HeLa infectadas por *T. gondii* e tratadas com anti-TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ recombinante humano**

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan. Após o ajuste para uma concentração de  $1 \times 10^5$  células a cada 200 $\mu$ l de meio, as mesmas foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13mm e permaneceram por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas com células aderidas foram lavadas e receberam 200 $\mu$ l de meio contendo anticorpo policlonal humano produzido em coelho contra TGF- $\beta$  humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) numa concentração de 10000ng/ml. Após 24 horas, parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram adicionados na proporção 5:1 (3 horas) e as células novamente tratadas com anti-TGF- $\beta$  humano (10000ng/ml) ou anti-TGF- $\beta$  (10000ng/ml) mais rIFN- $\gamma$  humano a 200ng/ml. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, fixadas em formol 10% em PBS por duas horas e coradas com azul de toluidina por 30 segundos. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e as células verificadas quanto ao número médio de parasitos intracelulares a cada 100 células infectadas examinadas (proliferação intracelular) e quanto à porcentagem de células infectadas a cada 100 células examinadas (índice de infecção).

#### **4.8. Teste Imunoenzimático ELISA Captura para IL-10 e TGF- $\beta$ 1**

O teste Imunoenzimático ELISA Captura foi realizado com o uso de kits para detectar as citocinas IL-10 (Amersham Biosciences, RPN 2785, Brasil) e TGF- $\beta$ 1 (Amersham Biosciences,

RPN 2774, Brasil) nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii*, de acordo com as instruções dos fabricantes.

#### **4.8.1. Detecção de IL-10**

Brevemente, uma placa de poliestireno de 96 orifícios foi sensibilizada com anticorpo contra IL-10 humano e incubada com os sobrenadantes de cultura por duas horas a temperatura ambiente. A placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem, recebeu anticorpo de detecção anti-IL-10 biotilado e permaneceu por 30 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens, a reação foi revelada com o complexo ABC-peroxidase (30 minutos a temperatura ambiente) e a placa novamente lavada. O substrato TMB (tetramethylbenzidine) foi adicionado (1 hora a temperatura ambiente), a reação interrompida com solução de ácido sulfúrico 0,18M e lida a 450nm em um leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Geneva, Switzerland). A curva padrão permitiu detectar valores no intervalo de 0,32 a 20pg/ml.

#### **4.8.2. Detecção de TGF- $\beta$ 1**

Primeiramente, as amostras de sobrenadantes de cultura foram tratadas com ácido e base para ativar a possível citocina existente no sobrenadante, uma vez que TGF- $\beta$  é secretado pelas células como um complexo inativo. O tratamento procedeu-se como se segue: 200 $\mu$ l de HCl 1M foi adicionado a 250 $\mu$ l de sobrenadante de cultura, com dez minutos de incubação a temperatura ambiente. Posteriormente, 200 $\mu$ l de NaOH 1,2M / Hepes 0,5M foi acrescentado para neutralizar o ácido.

Resumidamente, uma placa de poliestireno de 96 orifícios foi sensibilizada com anticorpo contra TGF- $\beta$ 1 humano e incubada com os sobrenadantes de cultura ativados por uma hora a 37C°. A placa foi lavada quatro vezes com PBS 0,01M e incubada com anticorpo de

detecção anti-TGF- $\beta$ 1 biotinilado por uma hora a 37°C. Após lavagens, streptavidina conjugada a peróxido de hidrogênio foi adicionada à placa (30 minutos a 37°C) e, depois de novas lavagens, o substrato TMB foi adicionado (30 minutos a temperatura ambiente) e a reação interrompida com solução de ácido sulfúrico 0,19M. A leitura da placa foi realizada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Geneva, Switzerland). A curva padrão permitiu detectar valores no intervalo 15,6 a 1000pg/ml.

#### **4.9. Análise Estatística**

Os dados foram analisados como média e desvio padrão e as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste Mann Whitney (Graph Pad Software, v. 4.0, San Diego, USA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando  $P \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Produção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *Toxoplasma gondii*

Células BeWo e HeLa foram mantidas em cultura por 24 horas e posteriormente infectadas ou não por *T. gondii*. Após mais 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para análise da produção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 por essas células.

Células BeWo infectadas por *T. gondii* (Figs. 1a e 1b) revelaram uma maior produção de IL-10 em relação às células não infectadas ( $P=0,0252$ ). Entretanto, a produção de IL-10 em células HeLa infectadas (Figs. 1c e 1d) ou não pelo parasito não demonstrou diferença estatística significativa. Além disso, não se observou nenhuma diferença significativa, quando se comparou a produção de IL-10 entre células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii* (Fig. 2a).

A análise do sobrenadante de células BeWo infectadas ou não pelo parasito não revelou produção detectável de TGF- $\beta$ 1 por essas células. No entanto, células HeLa produziram níveis detectáveis da citocina, embora nenhuma diferença estatística significativa foi observada quando se comparou presença ou ausência de *T. gondii* (Fig. 2b).

### 5.2. Influência de IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ na proliferação intracelular e no índice de infecção de *T. gondii* em células BeWo

As células foram mantidas em cultura e, após 24 horas, receberam exógenos de citocinas humanas (IL-10 ou TGF- $\beta$ 1) ou anticorpos humanos direcionados contra essas citocinas (anti-IL-10 ou anti-TGF- $\beta$ ). Em seguida, *T. gondii* (cepa RH) foi adicionado à cultura e, depois de três

horas, as células novamente receberam o tratamento com as mesmas citocinas ou anticorpos, seguido ou não de IFN- $\gamma$ .

**a) Análise da proliferação intracelular de *T. gondii***

Células BeWo, na presença de rIL-10 humana, demonstraram uma maior proliferação intracelular de *T. gondii* em relação às células não tratadas:  $9,6 \pm 1,04$  parasitos contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ). O mesmo padrão foi observado com o tratamento duplo de rIL-10 com rIFN- $\gamma$ :  $10,2 \pm 1,13$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ). Surpreendentemente, o tratamento único das células com rIFN- $\gamma$  aumentou a proliferação intracelular do parasito quando se comparou às células não tratadas:  $9,9 \pm 0,73$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ). A administração de anticorpos contra IL-10 em células BeWo não foi capaz de diminuir a taxa de proliferação intracelular de *T. gondii* em relação às células não tratadas:  $6 \pm 1$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \geq 0,05$ ). No entanto, o tratamento com o anticorpo acrescido de rIFN- $\gamma$  conseguiu controlar a proliferação intracelular de *T. gondii* em relação às células não tratadas:  $3,8 \pm 0,62$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 3a).

O tratamento de células BeWo com rTGF- $\beta 1$  aumentou a replicação intracelular de *T. gondii* quando se comparou às células não tratadas:  $10,7 \pm 1,15$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ). O mesmo padrão foi observado com o tratamento duplo de rTGF- $\beta 1$  com rIFN- $\gamma$ :  $11,6 \pm 0,43$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ). A administração de anticorpos contra essa citocina, na ausência ou presença de rIFN- $\gamma$ , não mostrou nenhum efeito sobre o número de parasitos intracelulares em células tratadas com relação às células não tratadas:  $6,5 \pm 0,66$  contra  $5,3 \pm 0,65$  e  $5,7 \pm 0,26$  contra  $5,3 \pm 0,65$  parasitos por célula, respectivamente (ambos  $P \geq 0,05$ ) (Fig. 3b).

Esses resultados demonstraram que células BeWo foram altamente susceptíveis a *T. gondii* na presença de IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ . A susceptibilidade ao parasito apenas é reduzida quando há o bloqueio da IL-10 endógena junto ao tratamento com IFN- $\gamma$ .

**b) Análise do índice de infecção de *T. gondii***

A população de células BeWo infectadas aumentou significativamente na presença do tratamento com rIL-10 em relação a ausência deste: 66,6% $\pm$ 9,23% contra 26,6% $\pm$ 7,02% de células infectadas ( $P\leq 0,05$ ). O mesmo padrão foi observado na presença do duplo tratamento, rIL-10 com rIFN- $\gamma$ : 74% $\pm$ 7,21% contra 26,6% $\pm$ 7,02% de células infectadas ( $P\leq 0,05$ ). Novamente, a população de células infectadas aumentou consideravelmente para células BeWo tratadas apenas com rIFN- $\gamma$  em relação às células não tratadas: 53% $\pm$ 11,26% contra 26% $\pm$ 7,02% de células infectadas ( $P\leq 0,05$ ). No entanto, a proporção de células BeWo infectadas permaneceu inalterada frente ao tratamento com anti-IL-10 ou anti-IL-10 + rIFN- $\gamma$  em relação às populações não tratadas: 37,6% $\pm$ 3,78% contra 26,6% $\pm$ 7,02% e 24,6% $\pm$ 9,07% contra 26,6% $\pm$ 7,02% de células infectadas, respectivamente (ambos  $P\geq 0,05$ ) (Fig. 4a).

A população de células BeWo infectadas também aumentou consideravelmente na presença de rTGF- $\beta$ 1 em relação às células não tratadas: 72% $\pm$ 10,81% contra 26,6% $\pm$ 7,02% de células infectadas ( $P\leq 0,05$ ). A mesma situação foi verificada em células com o duplo estímulo, rTGF- $\beta$ 1 + rIFN- $\gamma$ : 62,3% $\pm$ 24,13% contra 26,6% $\pm$ 7,02% de células infectadas ( $P\leq 0,05$ ). Entretanto, a proporção de células BeWo infectadas permaneceu inalterada frente ao tratamento com anti-TGF- $\beta$  ou anti-TGF- $\beta$  + rIFN- $\gamma$  em relação às populações não tratadas: 37,6% $\pm$ 3,78% contra 26,6% $\pm$ 7,02% e 33% $\pm$ 4,35% contra 26,6% $\pm$ 7,02% de células infectadas, respectivamente (ambos  $P\geq 0,05$ ) (Fig. 4b).

Esses dados obtidos revelaram que as populações de células BeWo foram mais infectadas pelo parasito na presença de IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ , entretanto o bloqueio de tais citocinas endógenas pelos anticorpos não controlaram o índice de infecção nessas células.

### **5.3. Influência de IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ na proliferação intracelular e no índice de infecção de *T. gondii* em células HeLa**

As células foram mantidas em cultura e, após 24 horas, receberam exógenos de citocinas humanas (IL-10 ou TGF- $\beta$ 1) ou anticorpos humanos direcionados contra essas citocinas (anti-IL-10 ou anti-TGF- $\beta$ ). Em seguida, *T. gondii* (cepa RH) foi adicionado à cultura e, depois de três horas, as células novamente receberam o tratamento com as mesmas citocinas ou anticorpos, seguido ou não de IFN- $\gamma$ .

#### **a) Análise da proliferação intracelular de *T. gondii***

Em células HeLa, na presença de rIL-10 humana, a proliferação intracelular de *T. gondii* não apresentou diferença estatística significativa em relação às células não tratadas:  $7 \pm 0,99$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula ( $P \geq 0,05$ ). Entretanto, na presença de rIL-10 + rIFN- $\gamma$ , ou apenas rIFN- $\gamma$ , a proliferação intracelular diminuiu drasticamente em relação às células não tratadas:  $4,1 \pm 0,11$  contra  $8,1 \pm 1,01$  e  $3,5 \pm 0,44$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula, respectivamente (ambos  $P \leq 0,05$ ). Da mesma maneira, anticorpos contra IL-10, administrados na ausência ou presença de rIFN- $\gamma$ , reduziram o crescimento intracelular do parasito quando se comparou às células não tratadas:  $6 \pm 0,46$  contra  $8,1 \pm 1,01$  e  $4,8 \pm 0,29$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula, respectivamente (ambos  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 5a).

Usando rTGF- $\beta$ 1, células HeLa novamente mostraram-se refratárias ao tratamento, pois a taxa de replicação intracelular de *T. gondii* não apresentou diferença estatística significativa em

relação às células não tratadas:  $8,5 \pm 1,16$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula ( $P \geq 0,05$ ). Mas, com o duplo estímulo rTGF- $\beta 1$  + rIFN- $\gamma$ , a média de parasitos intracelulares diminuiu consideravelmente em relação às células não tratadas:  $4,7 \pm 0,66$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ). O tratamento com anticorpo anti-TGF- $\beta$  não foi capaz de diminuir a proliferação de *T. gondii* quando se comparou às células não tratadas:  $8,4 \pm 0,75$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula ( $P \geq 0,05$ ). Entretanto, o duplo estímulo com o anticorpo e rIFN- $\gamma$  controlou o crescimento parasitário em relação às células não tratadas:  $4,5 \pm 0,59$  contra  $8,1 \pm 1,01$  parasitos por célula ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 5b).

Esses resultados indicaram que IL-10 e TGF- $\beta 1$  não influenciaram na proliferação intracelular de *T. gondii* em células HeLa, porém IFN- $\gamma$  agiu como potente inibidor dessa replicação. E, ao contrário de células BeWo, apenas o simples tratamento com anti-IL-10 foi capaz de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii*.

#### **b) Análise do índice de infecção de *T. gondii***

Na população de células HeLa, o índice de infecção na presença de rIL-10 permaneceu semelhante ao índice de infecção na ausência da citocina:  $69\% \pm 3,51\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \geq 0,05$ ). Já o índice de infecção em células HeLa tratadas com rIL-10 + rIFN- $\gamma$ , ou apenas rIFN- $\gamma$ , diminuiu em relação às células não tratadas:  $42\% \pm 3,46\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  e  $21,6\% \pm 3,51\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas, respectivamente (ambos  $P \leq 0,05$ ). As populações de células HeLa infectadas permaneceram inalteradas frente ao tratamento com anti-IL-10 em relação às populações não tratadas:  $66\% \pm 7,54\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \geq 0,05$ ). Em contrapartida, o índice de infecção caiu em células HeLa tratadas com anti-IL-10 e rIFN- $\gamma$  em relação às células não tratadas:  $40,6\% \pm 8,38\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 6a).

O índice de infecção em células HeLa tratadas com rTGF- $\beta$ 1 não foi influenciado pela citocina quando se comparou às células não tratadas:  $69,3\% \pm 16,04\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \geq 0,05$ ). No entanto, na presença de duplo estímulo, rTGF- $\beta$ 1 + rIFN- $\gamma$ , a proporção de células infectadas diminuiu significativamente em relação às células não tratadas:  $23,6\% \pm 4,04\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \leq 0,05$ ). Usando anticorpos contra essa citocina, a população de células infectadas permaneceu inalterada estatisticamente em relação às células não tratadas:  $70\% \pm 12,28\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \geq 0,05$ ). Porém, com o duplo tratamento anti-TGF- $\beta$  + rIFN- $\gamma$ , a população de células infectadas reduziu consideravelmente quando se comparou às células não tratadas:  $24\% \pm 2,64\%$  contra  $59\% \pm 8,54\%$  de células infectadas ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 6b).

Esses dados mostraram que as populações de células HeLa infectadas foram reduzidas apenas na presença de IFN- $\gamma$ .

## 6. DISCUSSÃO

*Toxoplasma gondii* é um parasito capaz de infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro, incluindo trofoblastos de roedores (Barbosa et al., 2006; Ferro et al., 1999; Ferro et al., 2002) e trofoblasto derivado de vilos coriônicos humanos (Abbasi et al., 2003). Na placenta hemocorial, o sangue materno banha direto e continuamente os tecidos fetais, enquanto que o sangue fetal está contido no interior de vasos sanguíneos. As subpopulações de trofoblasto, citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto, mais o mesênquima e o endotélio fetal formam a barreira placentária, por onde atravessam nutrientes, hormônios, oxigênio, gases entre outras moléculas para suprir o embrião (Gude et al., 2004); no entanto, a barreira placentária nem sempre é capaz de impedir a passagem de microorganismos patogênicos como *T. gondii*. Em roedores, duas razões justificam essa situação: a região placentária que separa porção materna e fetal é caracterizada por uma baixa incidência de macrófagos e linfócitos T, tornando essa área mais susceptível aos patógenos (Redline; Lu, 1988); paralelamente, os leucócitos maternos são potentes disseminadores de *T. gondii* e, ao entrarem em contato direto com o trofoblasto, o parasito pode facilmente alcançar os tecidos embrionários (Ferro et al., 2002).

Sendo o trofoblasto uma célula potencialmente susceptível à infecção pelo *T. gondii*, e considerando-se que o microambiente placentário é caracterizado por um perfil imunológico predominantemente Th2, o presente trabalho se propôs a investigar a participação de algumas citocinas do tipo 2 e do tipo 1 na susceptibilidade do trofoblasto a *T. gondii*. Para esse propósito, foi utilizada uma linhagem celular de coriocarcinoma humano (BeWo), que apresenta características morfológicas e bioquímicas semelhantes ao trofoblasto humano (Van der Ende et al., 1990). Como controle das situações experimentais, utilizou-se uma linhagem celular epitelial de útero humano (HeLa), uma vez que células HeLa apresentam alguns padrões de resposta à

infecção por *T. gondii* já conhecidos, como a expressão de NF- $\kappa$ B e RNAm para IL-8 (Kim et al., 2001).

Nossos resultados evidenciaram interessantes aspectos de uma linhagem celular trofoblástica (BeWo) frente à infecção por *T. gondii*. A principal conclusão dos resultados aqui relatados contribui para um melhor entendimento sobre os mecanismos imunológicos que acontecem na interface materno-fetal humana, que poderiam facilitar a passagem transplacentária da toxoplasmose. Os resultados aqui obtidos serão discutidos em tópicos para uma maior facilidade de compreensão.

### **6.1. Perfil de secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 por células BeWo e HeLa na presença ou ausência de *T. gondii***

Para avaliar se a produção de IL-10 ou TGF- $\beta$ 1 por células BeWo e HeLa relaciona-se com a presença de *T. gondii*, as mesmas foram cultivadas na presença ou ausência do parasito por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram coletados e analisados por teste Imunoenzimático ELISA Captura.

Maior detecção de IL-10 foi verificada em células BeWo infectadas. Provavelmente, o parasito agiu como um estímulo inflamatório para essas células, interferindo em suas propriedades fisiológicas e induzindo uma maior produção de IL-10. A maior produção de IL-10 em células BeWo infectadas por *T. gondii* nunca foi relatada na literatura até o momento, sendo este o primeiro trabalho a demonstrar esta situação. Esse resultado está de acordo com o perfil imunológico tipicamente Th2 encontrado no período gestacional (Lin et al., 1993; Raghupathy, 2001). A secreção dessa citocina já foi antes observada nessa linhagem celular, porém em baixos níveis ( $\leq 5$ pg/ml) e apenas a partir do sétimo dia de cultura (Bennett et

al., 1997). Nossos dados são concordantes, uma vez que células BeWo não infectadas e cultivadas por 24 horas produziram apenas níveis basais de IL-10. Bennett e colaboradores (1997) identificaram um aumento da secreção de IL-10 após estímulo com GM-CSF, variando entre 17 e 21pg/ml. Embora não produza GM-CSF, o trofoblasto humano apresenta receptores para esse fator de crescimento, que o torna responsivo a sua ação (Jokhi et al., 1994), permitindo uma melhor atividade funcional do trofoblasto e inibindo a sua apoptose (Bennett et al., 1997).

Apesar de *T. gondii* provocar um estímulo inflamatório em células BeWo, induzindo uma maior produção de IL-10 por essas células, Trautman e colaboradores (1997) não demonstraram produção significativa de IL-10 em trofoblastos humanos frente ao estímulo inflamatório causado por IL-1 $\beta$ , indicando que os tecidos gestacionais de origem fetal raramente expressam IL-10. No entanto, alguns estudos apontam a expressão e produção significativa de IL-10 e seu receptor em células trofoblásticas humanas (Hanna et al., 2000; Sacks et al., 2001; Roth et al., 1996). A presença dessa citocina nos tecidos placentários é dependente do estágio em que a gestação se encontra, uma vez que altas concentrações de IL-10 estão presentes em citotrofoblastos de primeiro e segundo trimestres gestacionais e baixos níveis de IL-10 são característicos da fase final da gestação ou ajudam a constituir os casos de nascimentos pré-maturos ou abortos espontâneos (Hanna et al., 2000). Os nascimentos pré-maturos estão associados muitas vezes a infecções na interface materno-fetal, principalmente corioamnionite (Yoon et al., 2000), uma vez que os estímulos inflamatórios nessa região influenciam na queda da produção de IL-10, que propicia um aumento na expressão de COX<sub>2</sub> e, conseqüentemente, de PGE<sub>2</sub>, moléculas intimamente envolvidas na regulação do parto. Esses dados sugerem que IL-10 possa ser um potente alvo terapêutico para intervenções clínicas com a finalidade de prevenir o parto pré-maturo (Hanna et al., 2006).

Ao contrário do observado na produção de IL-10 após infecção por *T. gondii*, em células BeWo não foi possível detectar a produção de TGF- $\beta$ 1. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que a não detecção de TGF- $\beta$ 1 seja um reflexo do limite de detecção da citocina oferecido pelo kit ELISA Captura, cuja curva padrão obtida variou nos intervalos de 15,6 a 1000pg/ml. Entretanto, células HeLa infectadas ou não por *T. gondii* não apresentaram diferenças significativas na produção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1.

TGF- $\beta$  já foi detectado em tecidos placentários humanos (Frolik et al., 1983), além de ser expresso pelo endométrio humano em diferentes estágios do ciclo menstrual, propiciando uma rápida proliferação celular e remodelamento tecidual (Jones et al., 2006). A produção e secreção de TGF- $\beta$  e activinas pelas glândulas epiteliais do endométrio sugerem o seu envolvimento na preparação do endométrio para a implantação do embrião. Um pico na expressão de TGF- $\beta$  tem sido observado na massa celular interna e no trofoblasto (Chow et al., 2001). Entretanto, as diferentes isoformas da citocina estão distribuídas de acordo com o tipo celular, pois as isoformas TGF- $\beta$ 1 e 2 são mais abundantes no citotrofoblasto, enquanto que TGF- $\beta$ 2 também possui expressão nas células decíduais e TGF- $\beta$ 3 de expressão exclusiva nas células imunes maternas (Ando et al., 1998; Simpson et al., 2002).

## **6.2. Interação de células BeWo e HeLa com *T. gondii* na presença de exógenos de IL-10 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos**

Células BeWo infectadas por *T. gondii* e tratadas com exógenos de rIL-10 humana, ao contrário de células HeLa, demonstraram uma maior vulnerabilidade ao parasito, já que a proliferação intracelular de *T. gondii* quase dobrou quando se comparou às células não tratadas. Provavelmente, isto seja o resultado da dependência de citocinas tipo 1 no combate ao

parasitismo (Araújo, 1991; Denkers; Gazzinelli, 1998; Gazzinelli et al., 1994), uma vez que uma resposta tipicamente anti-inflamatória, caracterizada por IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6 dentre outras citocinas, promovem uma inibição da resposta inflamatória (Moore et al., 2001; Tripp et al., 1993) e, portanto, permitem uma susceptibilidade aumentada à infecção pelo parasito. No entanto, estudos mostram que IL-10 não é fundamental para prevenir uma segunda resposta inflamatória exacerbada contra *T. gondii*, quando camundongos nocautes para essa citocina sobreviveram a uma segunda infecção pelo parasito sem desenvolver encefalite aguda (Wille et al., 2004). Provavelmente, outros fatores imunológicos estão envolvidos no equilíbrio da resposta imune do hospedeiro, impedindo imunopatologias que levariam a necrose tecidual e óbito.

Quando células BeWo receberam rIL-10, provavelmente a citocina tenha se ligado ao seu receptor e ativado uma cascata de sinalização intracelular nessas células, quando algumas proteínas kinases, como JAK, teriam a capacidade de fosforilar o fator de transcrição STAT-3 em seus resíduos de tirosina. Essa STAT-3 fosforilada formaria dímeros que, ao migrarem para o núcleo, novamente seriam fosforilados, mas agora em seus resíduos de serina, o que ativaria a função imunossupressora de IL-10 (Lang et al., 2002; Shen et al., 2004). Entretanto, esse mecanismo de ativação mediado por IL-10 é conhecido apenas em algumas linhagens celulares, como os macrófagos e, além disso, Butcher e colaboradores (2005) verificaram que a ativação de STAT-3 pode ser independente de IL-10, sendo *T. gondii* o próprio estímulo para indução desse fator de transcrição. Portanto, é de extremo interesse verificar se essa cascata de sinalização intracelular também opera em células trofoblásticas, o que promoveria a supressão dos fatores pró-inflamatórios dessas células e permitiria a sua estratégia de promoção à tolerância fetal durante a gestação e, ao mesmo tempo, maior susceptibilidade a infecções como por *T. gondii*.

Thouvenin e colaboradores (1997) demonstraram uma maior susceptibilidade à infecção pelo *Toxoplasma* em camundongos BALB/c gestantes, quando uma maior carga

parasitária foi observada no pulmão e cérebro desses animais. Dessa maneira, a resposta tipicamente Th2 tem um papel importante na infecção de gestantes, de modo que a probabilidade de passagem transplacentária do parasito cresce, portanto, estabelecendo-se a toxoplasmose congênita.

A replicação intracelular de *T. gondii* em células BeWo aumentou significativamente com o duplo tratamento, rIL-10 e rIFN- $\gamma$ , ou apenas com rIFN- $\gamma$ . Esta situação evidencia que essas células trofoblásticas não controlam o crescimento do parasito na presença de IFN- $\gamma$ , citocina potencialmente envolvida na resposta imune contra *T. gondii* (Entrican et al., 2002; Oliveira et al., 2006). Ao invés disso, rIFN- $\gamma$  parece propiciar a susceptibilidade dessas células ao parasito. Em casos de vilite crônica, causada normalmente por infecções maternas derivadas de patógenos (Juliano et al., 2006), os elementos inflamatórios, como as citocinas, induzem à expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto humano, que se adere especificamente aos seus ligantes na superfície de monócitos, ocasionando apoptose dessa subpopulação trofoblástica (Garcia-Lloret et al., 2000; Xiao et al., 1997). Essa apoptose direciona a danos na barreira placentária, que funcionariam como rotas de infiltração de leucócitos para o interior dos vilos. Placentas com vilite e intervilosite (inflamação do espaço intervilosos) de etiologias desconhecidas, ou causadas por infecções provenientes de *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii*, evidenciaram um influxo de macrófagos, linfócitos e granulócitos culminando com a destruição da barreira placentária, próprios da alta expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto que atrai essas células imunes para o local (Juliano et al., 2006). Assim, IFN- $\gamma$  pode agir na indução de ICAM-1 em células BeWo, o que permitiria a *T. gondii* uma maior aderência nessas células, uma vez que já foi relatado a migração desse parasito via ICAM-1 em tecidos placentários (Barragan et al., 2005). Além disso, já foi demonstrada a expressão de ICAM-1 em células BeWo sob estímulo de

IFN- $\gamma$ , o que facilitou a adesão de monócitos infectados por *T. gondii*, proporcionando, conseqüentemente, a migração de parasitos para essas células trofoblásticas (Pfaff et al., 2005a). Talvez essa situação seja um retrato do que ocorre no organismo materno *in vivo*, quando a resposta imune desencadeada por células e citocinas pró-inflamatórias induz a expressão de ICAM-1 na superfície do sinciciotrofoblasto, que se liga especificamente aos monócitos infectados por *T. gondii*, facilitando a infecção dos tecidos fetais. Tendo maior aderência, maior a taxa de invasão e, conseqüentemente, maior proliferação intracelular parasitária.

A passagem transplacentária de *Toxoplasma* facilitada por IFN- $\gamma$  já foi antes observada em camundongos BALB/c e em animais deficientes para células T e B, quando a administração de anticorpos contra IFN- $\gamma$  diminuíram a transmissão vertical do parasito (Abou-Bacar et al., 2004). TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 $\beta$  são os mais potentes indutores da expressão de moléculas adesivas, como ICAM-1 (Shrikant et al., 1994). IFN- $\gamma$ , além de possivelmente induzir expressão de ICAM-1 em células BeWo, pode também ativar proteínas kinases, como MAPK, e fatores de transcrição, como STAT-3. Assim, mesmo sob estímulo inflamatório, células BeWo, como o trofoblasto humano a termo, seriam capazes de re-estabelecer o status imunológico materno apropriado para o curso de uma gestação normal (Jiang et al., 2006). Dessa maneira, IFN- $\gamma$  agiria na indução de STAT-3, proporcionando o retorno da homeostase que deve existir entre mãe e feto para a manutenção da gravidez.

Com relação ao índice de infecção, foi possível observar que, na presença de rIL-10 ou rIFN- $\gamma$ , a população de células infectadas é consideravelmente maior em relação às células sem tratamento com as citocinas. Dessa maneira, tanto rIL-10 como rIFN- $\gamma$  influenciam na proliferação e na invasão de *T. gondii* em BeWo, demonstrando que essas citocinas têm ação tanto em nível intracelular quanto de membrana.

Quando se observou o comportamento de células HeLa na presença concomitante de rIL-10 e rIFN- $\gamma$ , ou apenas com rIFN- $\gamma$ , tanto a proliferação intracelular quanto o índice de infecção sofreram redução. Esses resultados estão de acordo com a típica resposta imune encontrada contra *T. gondii* (Oliveira et al., 2006). Um dos mecanismos de ação de IFN- $\gamma$  é a indução da IDO, que degrada o triptofano requerido para o crescimento parasitário, já observada em vários tipos celulares, incluindo células HeLa (Däubener et al., 2001; Entrican et al., 2002; Werner-Felmayer et al., 1989).

### **6.3. Interação de células BeWo e HeLa com *T. gondii* na presença de anticorpo humano contra IL-10**

O tratamento de células BeWo com anticorpo humano direcionado contra IL-10 não foi capaz de controlar a replicação intracelular de *T. gondii*, porém o anticorpo administrado juntamente com rIFN- $\gamma$  reduziu a replicação do parasito. Em contrapartida, quando se analisou o índice de infecção, o anticorpo sozinho ou paralelo ao rIFN- $\gamma$  não alteraram o número de células BeWo infectadas por *T. gondii*.

Isto pode ser explicado pelo fato de IFN- $\gamma$  induzir uma queda da expressão do receptor tipo 1 para IL-10 (IL-10R1), o que diminuiria a passagem de IL-10 para o interior da célula, impedindo sua ação autócrina. O mesmo fato acontece com células deciduais humanas na presença de IFN- $\gamma$  a 100ng/ml, cujo efeito na diminuição dos receptores para IL-10 nessas células é observado dentro de 45 minutos (Xing; Gui, 2006). Em casos de leishmanioses de mucosa observadas em humanos, o local da lesão é constituído principalmente de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e uma baixa expressão de receptores para IL-10 (Faria et al., 2005), o que prova mais uma vez a ação de IFN- $\gamma$  contra a expressão de receptores para IL-10.

É importante também considerar que a ação de IFN- $\gamma$  em células trofoblásticas possa ser dependente de IL-10, explicando o fato de IFN- $\gamma$  tornar células BeWo susceptíveis ao parasito na presença de IL-10 endógena e exógena. E, na medida que a citocina endógena é bloqueada, IFN- $\gamma$  volta a atuar de maneira característica, controlando a infecção por *T. gondii*. Entretanto, a diferença de ação de IFN- $\gamma$  na presença de IL-10 ainda não foi descrita na literatura até o momento, sendo este o primeiro trabalho a apresentar essa situação, mostrando a necessidade de futuros estudos para clarear essa questão.

Para células HeLa, a proliferação intracelular do parasito diminuiu com o tratamento de anticorpo sozinho ou com rIFN- $\gamma$ , porém o índice de infecção apenas reduziu na presença de rIFN- $\gamma$ . Assim, apenas o bloqueio da IL-10 endógena foi o suficiente para controlar o crescimento, mas não a invasão, de *T. gondii* nessas células. Provavelmente, células BeWo apresentam uma fisiologia diferente de células HeLa, o que sugere que células trofoblásticas possuem um comportamento distinto das demais células maternas no intuito de prevenir uma rejeição do concepto.

#### **6.4. Interação de células BeWo e HeLa com *T. gondii* na presença de exógenos de TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ recombinantes humanos**

O tratamento de células BeWo com exógenos de rTGF- $\beta$ 1 humano, ao contrário de células HeLa, resultou em um significativo aumento da replicação e invasão celular de *T. gondii*. O mesmo tratamento junto ao rIFN- $\gamma$  também resultou em aumento da replicação e da invasão do parasito em BeWo. Entretanto, em células HeLa, rIFN- $\gamma$  provocou uma queda na proliferação intracelular e no índice de infecção. Esses resultados são semelhantes àqueles

observados para IL-10, sugerindo fortemente que IL-10 e TGF- $\beta$ 1 possuam um papel fundamental na manutenção do perfil imunológico apropriado à gestação.

O aumento da replicação de *T. gondii* sob estímulo de TGF- $\beta$  já foi antes observado em células epiteliais pigmentares da retina humana (Naginei et al., 2002). Este estudo prévio demonstrou que *T. gondii* influencia na expressão de RNAm para TGF- $\beta$  e aumenta a secreção de TGF- $\beta$ 1 e 2, ao mesmo tempo que torna o meio favorável à proliferação do parasito, mesmo sob a concentração de 20ng/ml. Similares resultados foram observados, quando a adição de TGF- $\beta$ 1 recombinante em macrófagos peritoniais murinos ou em macrófagos humanos aumentou a replicação intracelular de *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* (Barral-Netto et al., 1992; Silva et al., 1991). Além disso, TGF- $\beta$  pode estar envolvido na inibição de TNF- $\alpha$  em células BeWo, uma vez que TNF- $\alpha$  já foi observado no trofoblasto humano normal (Chen et al., 1991; Haynes et al., 1993; King et al., 1995). TGF- $\beta$  interfere na atividade microbicida de macrófagos murinos por inibir a sua produção de TNF- $\alpha$ , culminando com a susceptibilidade dessas células a *T. gondii* (Langermans et al., 2001), portanto, a mesma situação pode estar ocorrendo em células BeWo tratadas com TGF- $\beta$ 1.

#### **6.5. Interação de células BeWo e HeLa com *T. gondii* na presença de anticorpo humano contra TGF- $\beta$**

A adição de anticorpo humano contra TGF- $\beta$  em cultura de células BeWo infectadas por *T. gondii*, na presença ou ausência de rIFN- $\gamma$ , não controlaram a proliferação e o índice de infecção celular. Essa situação era esperada, uma vez que a produção de TGF- $\beta$ 1 não foi observada por essas células. Entretanto, como observado previamente, rIFN- $\gamma$  aumentou a susceptibilidade de BeWo ao parasito, porém, com a adição do anticorpo, esse efeito foi

reprimido. Provavelmente, o anticorpo interferiu na cascata de sinalização do receptor para IFN- $\gamma$ , impedindo sua ação. Esse efeito já foi visualizado, embora de modo oposto, por Zhang e colaboradores (2004), quando IFN- $\gamma$  alterou para um mínimo o índice de expressão de receptores para TGF- $\beta$  em hepatócitos de camundongos infectados por *Schistosoma japonicum*. O mesmo ocorre em células do corpo lúteo de macacas prenhes no início da gestação, quando IFN- $\gamma$  tem a capacidade de regular a expressão de receptores para TGF- $\beta$  nessas células (Chen et al., 2003). Entretanto, são necessários estudos futuros para explicar melhor esses dados, por exemplo, verificar se há homologia entre os receptores de IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ . E, no que se refere às células HeLa, tanto a proliferação intracelular quanto o índice de infecção permaneceram semelhantes com a administração de anti-TGF- $\beta$ , no entanto, o anticorpo adicionado simultaneamente com rIFN- $\gamma$  reduziu esses parâmetros. Ao contrário do observado com anticorpo contra IL-10, anti-TGF- $\beta$  não foi suficiente para controlar a replicação de *T. gondii* em células HeLa.

Finalmente, é evidente que as células trofoblásticas possuem um metabolismo celular diferente das demais células, como HeLa. Isso reflete a situação de que o trofoblasto estabelece estratégias que possibilitam a manutenção do feto no organismo materno sem qualquer mecanismo de rejeição. Dentre as diferentes estratégias, as citocinas parecem ser fundamentais, especialmente IL-10 e TGF- $\beta$ 1. Portanto, há maior probabilidade de infecções maternas por patógenos durante o período gestacional, uma vez que o organismo da mãe é modulado imunologicamente pelas células trofoblásticas para manter a gravidez. Mas, ao mesmo tempo, torna possível a passagem transplacentária de *T. gondii*, estabelecendo assim o acesso do parasito ao concepto e o estabelecimento da toxoplasmose congênita.

## 7. CONCLUSÕES

- Células BeWo infectadas por *Toxoplasma gondii* produzem maior quantidade de IL-10;
- A susceptibilidade de células trofoblásticas BeWo a *T. gondii* é aumentada na presença de IL-10 ou TGF- $\beta$ 1, seguido ou não de administração de IFN- $\gamma$ ;
- IFN- $\gamma$  propicia maior proliferação e invasão celulares de *T. gondii* em células trofoblásticas BeWo;
- A susceptibilidade de células trofoblásticas BeWo a *T. gondii* é apenas diminuída com a administração de anti-IL-10 acrescido de IFN- $\gamma$ , demonstrando que o trofoblasto responde de maneira distinta das demais células maternas;
- IL-10 e TGF- $\beta$ 1 são citocinas que participam da imunomodulação presente no microambiente placentário, prevenindo rejeição fetal e, ao mesmo tempo, propiciam a transmissão de *T. gondii* para os tecidos fetais.

## **8. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**

**Universidade Federal de Uberlândia****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP -38400-089 ☎(034) 239 4131 - 235-2078

Uberlândia, 11 de março de 2002.

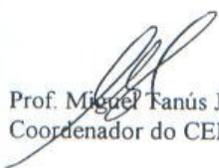
Processo n.º 017/2002

**PROJETO DE PESQUISA:** "Invasão e Replicação do *Toxoplasma gondii* em linhagem de células de Carcinoma Humano (BEWO): Uma Abordagem Congênita".

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Eloísa Amália Vieira Ferro

**PARECER:**

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem.

  
Prof. Miguel Fanús Jorge  
Coordenador do CEP/UFU

## **9. FIGURAS**

## FIGURA 1

**Figura 1:** Fotomicrografias de células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) **(a,b)** e de células epiteliais do cervix uterino humano (linhagem HeLa) **(c,d)** após 24 horas de infecção por *T. gondii* (setas). Coloração por azul de toluidina. Aumento de 450X. Barras: 22µm.

## FIGURA 2

**Figura 2:** Produção de IL-10 (a) e TGF- $\beta$ 1 (b) por células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii*: as células cultivadas por 24 horas receberam ou não parasitos da cepa RH de *T. gondii* na proporção 5:1, e permaneceram por mais 24 horas em cultura. Os sobrenadantes foram coletados e a detecção das citocinas foi realizada por meio de ELISA Captura. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes foram consideradas quando  $P \leq 0,05$ .

### FIGURA 3

**Figura 3a:** Efeitos dos tratamentos de rIL-10; anti-IL-10; rIFN- $\gamma$ ; rIL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-IL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo após 24 horas de infecção. A proliferação intracelular corresponde ao número médio de parasitos por célula a cada 100 células infectadas examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando \* $P \leq 0,05$ .

**Figura 3b:** Efeitos dos tratamentos de rTGF- $\beta 1$ ; anti-TGF- $\beta$ ; rIFN- $\gamma$ ; rTGF- $\beta 1$  mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-TGF- $\beta$  mais rIFN- $\gamma$ ; na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo após 24 horas de infecção. A proliferação intracelular corresponde ao número médio de parasitos por célula a cada 100 células infectadas examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando \* $P \leq 0,05$ .

## FIGURA 4

**Figura 4a:** Efeitos dos tratamentos de rIL-10; anti-IL-10; rIFN- $\gamma$ ; rIL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-IL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; no índice de infecção de *T. gondii* em células BeWo após 24 horas de infecção. O índice de infecção corresponde ao número de células infectadas a cada 100 células examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando \* $P \leq 0,05$ .

**Figura 4b:** Efeitos dos tratamentos de rTGF- $\beta 1$ ; anti-TGF- $\beta$ ; rIFN- $\gamma$ ; rTGF- $\beta 1$  mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-TGF- $\beta$  mais rIFN- $\gamma$ ; no índice de infecção de *T. gondii* em células BeWo após 24 horas de infecção. O índice de infecção corresponde ao número de células infectadas a cada 100 células examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando \* $P \leq 0,05$ .

## FIGURA 5

**Figura 5a:** Efeitos dos tratamentos de rIL-10; anti-IL-10; rIFN- $\gamma$ ; rIL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-IL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; na proliferação intracelular de *T. gondii* em células HeLa após 24 horas de infecção. A proliferação intracelular corresponde ao número médio de parasitos por célula a cada 100 células infectadas examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando \* $P \leq 0,05$ .

**Figura 5b:** Efeitos dos tratamentos de rTGF- $\beta 1$ ; anti-TGF- $\beta$ ; rIFN- $\gamma$ ; rTGF- $\beta 1$  mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-TGF- $\beta$  mais rIFN- $\gamma$ ; na proliferação intracelular de *T. gondii* em células HeLa após 24 horas de infecção. A proliferação intracelular corresponde ao número médio de parasitos por célula a cada 100 células infectadas examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando \* $P \leq 0,05$ .

## FIGURA 6

**Figura 6a:** Efeitos dos tratamentos de rIL-10; anti-IL-10; rIFN- $\gamma$ ; rIL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-IL-10 mais rIFN- $\gamma$ ; no índice de infecção de *T. gondii* em células HeLa após 24 horas de infecção. O índice de infecção corresponde ao número de células infectadas a cada 100 células examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando  $*P \leq 0,05$ .

**Figura 6b:** Efeitos dos tratamentos de rTGF- $\beta$ 1; anti-TGF- $\beta$ ; rIFN- $\gamma$ ; rTGF- $\beta$ 1 mais rIFN- $\gamma$ ; e anti-TGF- $\beta$  mais rIFN- $\gamma$ ; no índice de infecção de *T. gondii* em células HeLa após 24 horas de infecção. O índice de infecção corresponde ao número de células infectadas a cada 100 células examinadas. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão dos dados obtidos. Esta é uma análise representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio) foram consideradas quando  $*P \leq 0,05$ .

figura 1

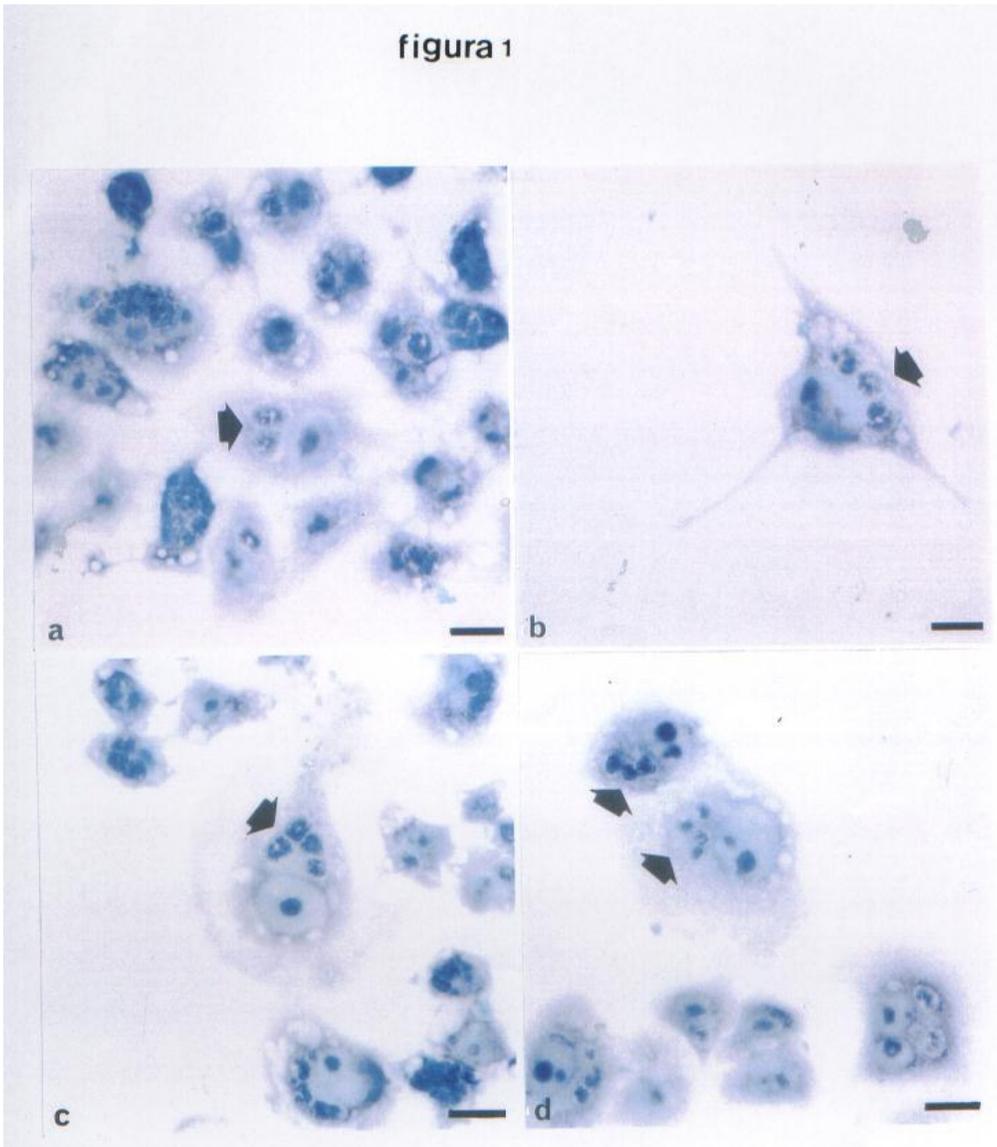




Figura 3

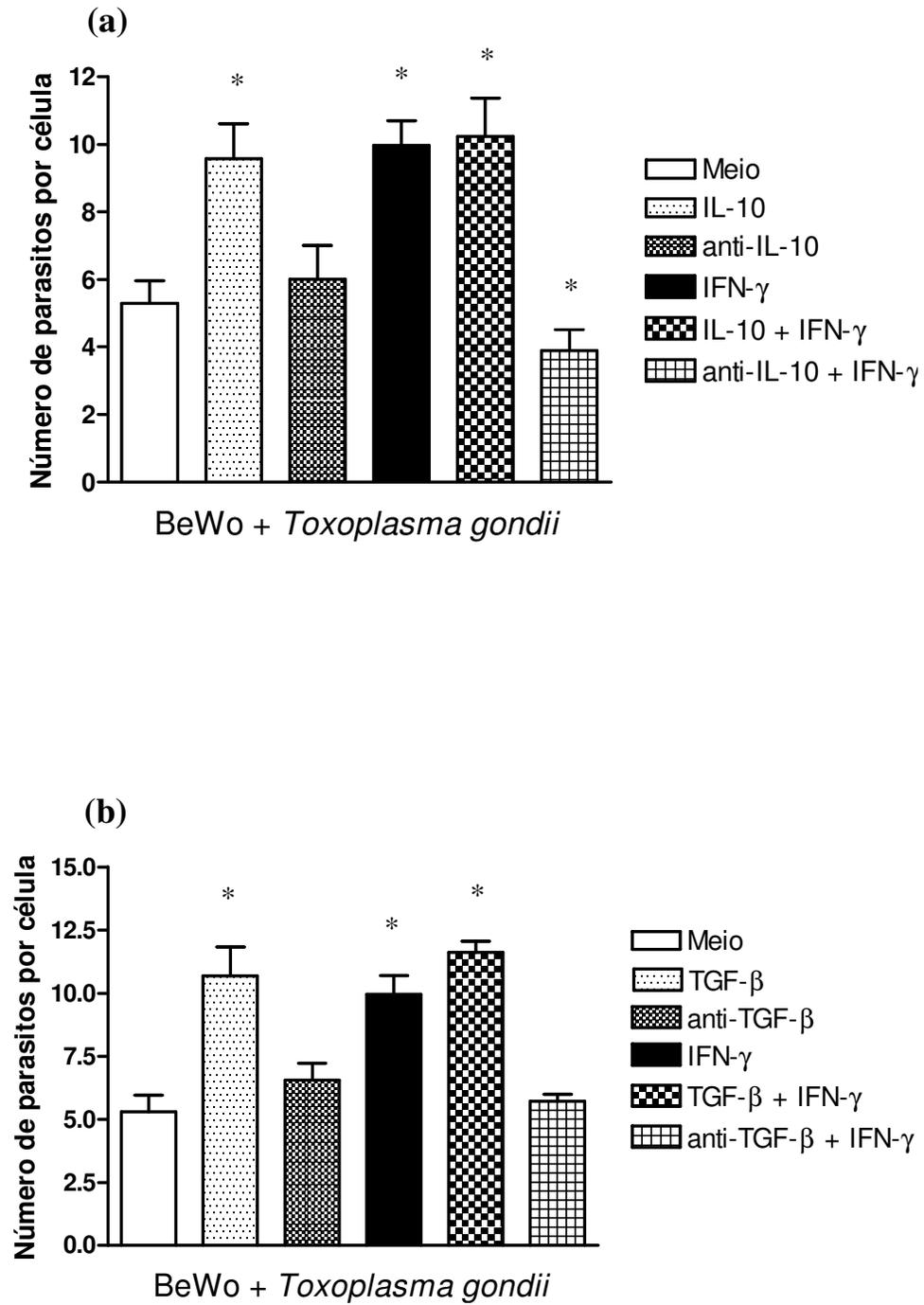


Figura 4

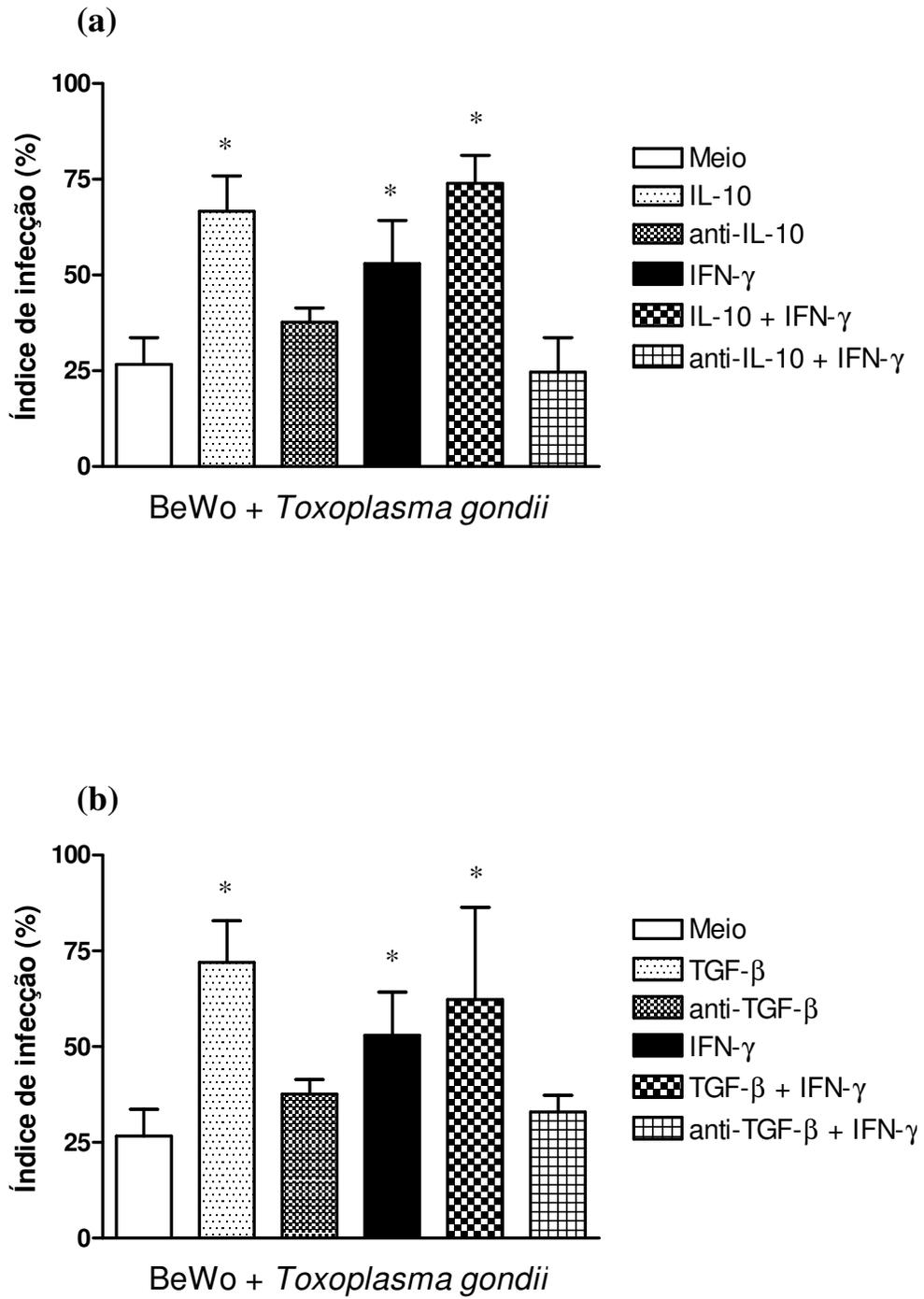


Figura 5

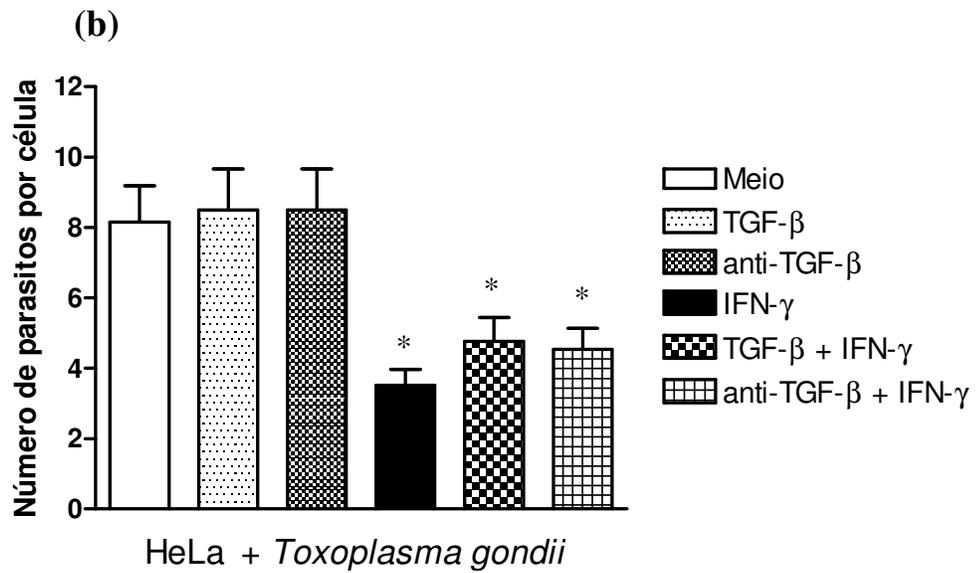
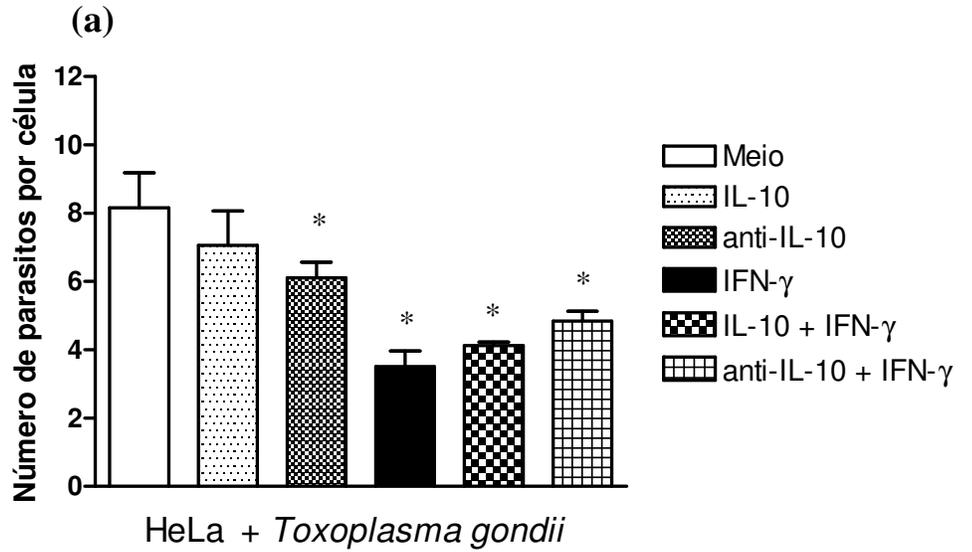
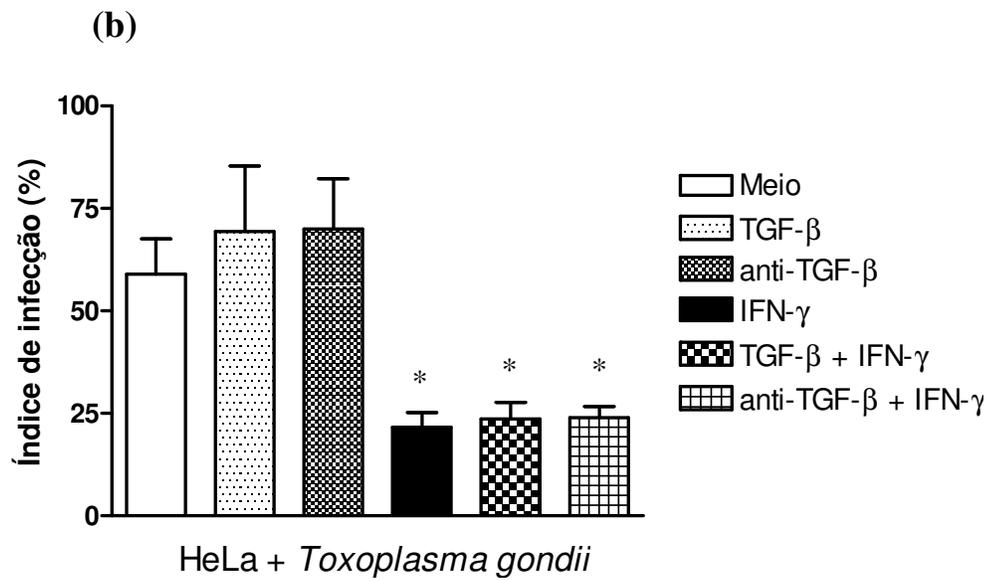
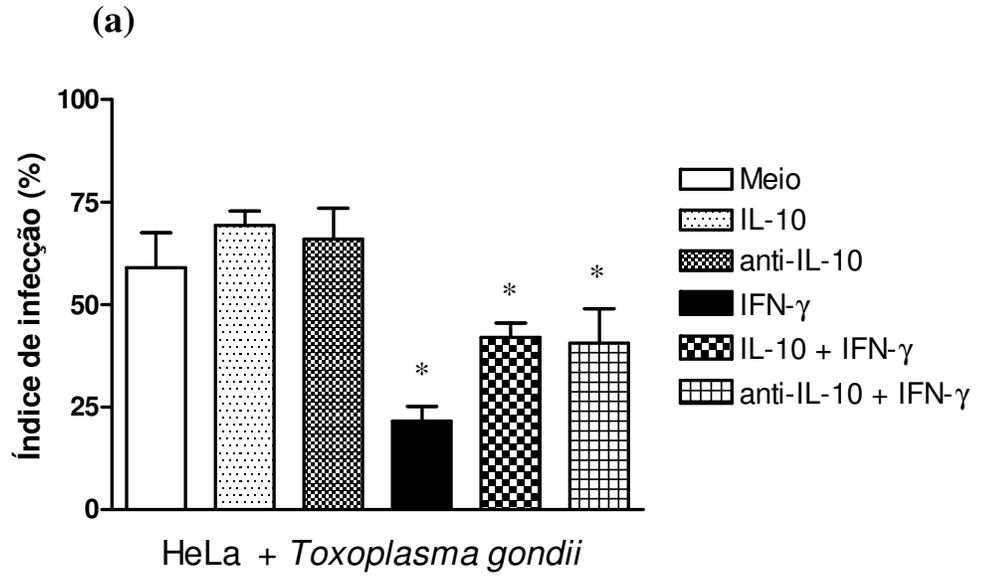


Figura 6



## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5<sup>o</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders., 2003. 562p.

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, Alberta, v. 188, n<sup>o</sup> 4, p. 608-616, Aug., 2003.

ABRAHAMS, V. M.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New Haven, v. 51, n<sup>o</sup> 4, p. 275-282, Apr., 2004.

AHN, H. J.; KIM, S.; NAM, H. W. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Korea, v. 331, n<sup>o</sup> 2, p. 614-620, Jun., 2005.

ALEXANDER, C. M.; HANSELL, E. J.; BEHRENDTSEN, O.; FLANNERY, M. L.; KISHNANI, N. S.; HAWKES, S. P.; WERB, Z. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. **Development**, San Francisco, v. 122, n<sup>o</sup> 6, p. 1723-1736, Jun., 1996.

ALEXANDER, J.; JEBBARI, H.; BLUETHMANN, H.; BROMBACHER, F.; ROBERTS, C. W. The role of IL-4 in adult acquired and congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, Glasgow, v. 28, n<sup>o</sup> 1, p. 113-120, Jan., 1998.

ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu. Rev. Immunol.**, Parkville, v. 22, p. 503-529, Apr., 2004.

ALIBERTI, J.; BAFICA, A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. **Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.**, Durham, v. 73, n° 3-4, p. 283-288, Sep-Oct., 2005.

ALIBERTI, J.; SERHAN, C.; SHER, A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. **J. Exp. Med.**, Bethesda, v. 196, n° 9, p. 1253-1262, Nov., 2002.

ANDO, N.; HIRAHARA, F.; FUZUSHIMA, J.; KAWAMOTO, S.; OKUDA, K.; FUNABASHI, T.; GORAI, I.; MINAGUCHI, H. Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Yokohama, v. 40, n° 1, p. 48-56, Jul., 1998.

APLIN, J. D. The cell biological basis of human implantation. **Baillieres. Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, Manchester, v. 14, n° 5, p. 757-764, Oct., 2000.

ARAUJO, F. G. Depletion of the L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Infect. Immun.**, Palo Alto, v. 59, n° 5, p. 1614-1619, May., 1991.

ARAUJO, F. G.; SLIFER, T. Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. **Infect. Immun.**, Palo Alto, v. 71, n° 7, p. 4171-4174, Jul., 2003.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.**, Ontario, v. 192, n° 2, p. 259-270, Jul., 2000.

BANNENBERG, G. L.; ALIBERTI, J.; HONG, S.; SHER, A.; SERHAN, C. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. **J. Exp. Med.**, Boston, v. 199, n° 4, p. 515-523, Feb., 2004.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, Uberlândia, artigo "in press", doi: 10.1016/j.placenta.2006.10.011, 2006.

BARIL, L.; ANCELLE, T.; GOULET, V.; THULLIEZ, P.; TIRARD-FLEURY, V.; CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. **Scand. J. Infect. Dis.**, Saint-Maurice, v. 31, n° 3, p. 305-309, 1999.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell. Microbiol.**, St. Louis, v. 7, n° 4, p. 561-568, Apr., 2005.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor- $\beta$  in Leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, Salvador, v. 257, n° 5096, p. 545-548, Jul., 1992.

BELLONI, A.; AUBERT, D.; MARIN, J. E. G.; NAOUR, R. L.; BONHOMME, A.; GUENOUNOU, M.; PINON, J. M. Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  during infection of human monocyte cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, Reims, v. 86, n° 5, p. 406-412, May., 2000.

BENNETT, W. A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; WHITWORTH, N. S.; BRACKIN, M. N.; HALE, E.; COWAN, B. D. Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. **Early Pregnancy: Biology and Medicine**, Jackson, v. 3, n° 3, p. 190-198, Sep., 1997.

BENYO, D. F.; SMARASON, A.; REDMAN, C. W. G.; SIMS, C.; CONRAD, K. P. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Pittsburgh, v. 86, n° 6, p. 2505-2512, Jun., 2001.

BOBIC, B.; JEVREMOVIC, I.; MARINKOVIC, J. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. **Eur. J. Epidemiol.**, Belgrade, v. 14, n° 6, p. 605-610, Sep., 1998.

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

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

BOWEN, J. M.; CHAMLEY, L.; MITCHELL, M. D.; KEELAN, J. A. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. **Placenta**, Nova Zelândia, v. 23, n° 4, p. 239-256, Apr., 2002.

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

CAL, R. G. R.; MARRA, A. R.; LEWI, D. S.; WEY, S. B. Toxoplasmose pulmonar – ocorrência em adulto imunocompetente. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 49, n° 2, p. 117-136, 2003.

CANIGGIA, I.; LYE, S. J.; CROSS, J. C. Activin is a local regulatory of human cytotrophoblast cell differentiation. **Endocrinology**, Ontario, v. 138, n° 9, p. 3976-3986, 1997.

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

CARRUTHERS. V. B.; SIBLEY, L. D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Mol. Microbiol.**, St. Louis, v. 31, n° 2, p. 421-428, Jan., 1999.

CESBRON-DELAUW, M. F. Dense-granules organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. **Parasitol. Today.**, Lille, v. 10, n° 8, p. 293-296, Aug., 1994.

CHANNON, J. Y.; SEGUIN, R. M.; KASPER, L. H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infect. Immun.**, New Hampshire, v. 68, n° 8, p. 4822-4826, Aug., 2000.

CHAOUAT, G.; MENU, E.; CLARK, D. A.; DY, M.; MINKOWSKI, M.; WEGMANN, T. G. Control of fetal survival in CBAxDBA/2 mice by lymphokine therapy. **J. Reprod. Fertil.**, Paris, v. 89, n° 2, p. 447-458, Jul., 1990.

CHAVES-BORGES, F. A.; SOUZA, M. A.; SILVA, D. A. O.; KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1 (p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, São Paulo, v. 41, n° 6, p. 329-338, Nov-Dec., 1999.

CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; HORNOY, P.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; BORY, J. P.; PINON, J. M. Preconceptional seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Reims, v. 9, n° 2, p. 489-490, Mar., 2002.

CHEN, H. L.; YANG, Y.; HU, X. L.; YELAVARTHI, K. K.; FISHBACK, J. L.; HUNT, J. S. Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at late and early stages of gestation. **Am J. Pathol.**, Kansas, v. 139, n° 2, p. 327-335, Aug., 1991.

CHEN, X. L.; GAO, H. J.; WEI, P.; SONG, X. X.; HU, Z. Y.; LIU, Y. X. Regulatory effect of IFN-gamma on expression of TGF-beta1, T beta R-II, and StAR in corpus luteum of pregnant rhesus monkey. **Acta. Pharmacol. Sin.**, Beijing, v. 24, n° 5, p. 435-441, May., 2003.

CHOW, J. F.; LEE, K. F.; CHAN, S. T.; YEUNG, W. S. Quantification of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA expression in mouse preimplantation embryos and determination of TGFbeta receptor (type 1 and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract. **Mol. Hum. Reprod.**, Hong Kong, v. 7, n° 11, p. 1047-1056, Nov., 2001.

CHURCH, H. J.; APLIN, J. D. BeWo choriocarcinoma cells produce laminin 10. **Biochem. J.**, Manchester, v. 332, n° 2, p. 491-498, Jun., 1998.

CLARK, D. A.; VINCE, G.; FLANDERS, K. C.; HIRTE, H.; STARKEY, P. CD56+ lymphoid cells in human first trimester pregnancy decidua as a source of novel transforming growth factor-beta- 2-related immunosuppressive factors. **Hum. Reprod.**, Ontario, v. 9, n° 12, p. 2270-2277, Dec., 1994.

CRUZ CUBAS, A. B.; GENTILLINI, M.; MONJOUR, M. Cytokines and T cell response in malaria. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 48, n° 1, p. 27-33, 1994.

DAHER, S.; DENARDI, K. A. G.; BLOTTA, M. H. S. L.; MAMONI, R. L.; RECK, A. P. M.; CAMANO, L.; MATTAR, R. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **J. Reprod. Immunol.**, São Paulo, v. 62, n° 1-2, p. 151-157, Jun., 2004.

DÄUBENER, W.; SPORTS, B.; HUCKE, C.; ADAM, R.; STINS, M.; KIM, K. S.; SCHROTEN, H. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infect. Immun.**, Dusseldorf, v. 69, n° 10, p. 6527-6531, Oct., 2001.

DAYNES, R. A.; ARANCO, B. A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. **Eur. J. Immunol.**, Salt Lake, v. 19, n° 12, p. 2319-2325, Dec., 1989.

DECKERT-SCHLUTER, M.; BUCK, C.; WEINER, D.; KAEFER, N.; RANG, A.; HOF, H.; WIESTLER, O. D.; SCHLUTER, D. Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. **J. Neuroimmunol.**, Heidelberg, v. 76, n° 1-2, p. 167-176, Jun., 1997.

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

DEROUICH-GUERGOUR, D.; ALDEBERT, D.; VIGAN, I.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARCHE, P. N.; AUBERT, D.; AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. *Toxoplasma gondii* infection can regulate the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptors on human cells *in vitro*. **Parasite. Immunol.**, Reims, v. 24, n° 5, p. 271-279, May., 2002.

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

DRAKE, B. L.; HEAD, J. R. Murine trophoblast cells can be killed by lymphokine activated killer (LAK) cells. **J. Immunol.**, Dallas, v. 143, n° 1, p. 9-14, Jul., 1989.

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

DUDLEY, D. J.; CHEN, C. L.; MURRAY, M. D.; DAYNES, R. A.; ARANEO, B. A. Adaptive immune responses during murine pregnancy: pregnancy-induced regulation of lymphokine

production by activated T lymphocytes. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Salt Lake, v. 168, n° 4, p. 1155-1163, Apr., 1993.

DZIADEK, B.; DZIADEK, J.; DLUGONSKA, H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. **Exp. Parasitol.**, Polônia, v. 115, n° 3, p. 277-282, Mar., 2007.

EGAWA, H.; FUJIWARA, H.; HIRANO, T.; NAKAYAMA, T.; HIGUCHI, T.; TATSUMI, K.; MORI, T.; FUJII, S. Peripheral blood mononuclear cells in early pregnancy promote invasion of human choriocarcinoma cell line, BeWo cells. **Hum. Reprod.**, Kyoto, v. 17, n° 2, p. 473-480, Feb., 2002.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J. Comp. Pathol.**, Edinburgh, v. 126, n° 2-3, p. 79-94, Feb-Apr., 2002.

ENTRICAN, G.; WATTEGEDERA, S.; CHUI, M.; OEMAR, L.; ROCCHI, M.; McINNES, C. Gamma interferon fails to induce expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and does not control the growth of *Chlamydomphila abortus* in BeWo trophoblast cells. **Infect. Immun.**, Edinburgh, v. 70, n° 5, p. 2690-2693, May., 2002.

FARIA, D. R.; GOLLOB, K. J.; BARBOSA, J. Jr.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P. R.; LESSA, H.; CARVALHO, L. P.; ROMANO-SILVA, M. A.; JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; DUTRA, W. O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect. Immun.**, Belo Horizonte, v. 73, n° 12, p. 7853-7859, Dec., 2005.

FATOOHI, A. F.; COZON, G. J. N.; GONZALO, P.; MAYENCON, M.; GREENLAND, T.; PICOT, S.; PEYRON, F. Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in human. **Clin. Exp. Immunol.**, Lyon, v. 136, n° 3, p. 535-541, Jun., 2004.

FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 2000. 147f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MORTARA, R. A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitol. Res.**, Uberlândia, v. 85, nº 8-9, p. 647-654, Aug., 1999.

FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect. Immun.**, São Paulo, v. 70, nº 12, p. 7089-7094, Dec., 2002.

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

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIC, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O’GARRA, A. IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, Palo Alto, v. 146, nº 10, p. 3444-3451, May., 1991.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. **Exp. Parasitol.**, Montevideo, v. 112, nº 1, p. 8-12, Jan., 2006.

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

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukin (IL)-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, Hasama-machi, v. 21., n° 4, p. 354-360, May., 2000.

GARCIA-LLORET, M.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. **J. Leukoc. Biol.**, Los Angeles, v. 68, n° 6, p. 903-908, Dec., 2000.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 153, n° 6, p. 2533-2543, Sep., 1994.

GORELIK, L.; FRAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. **Nat. Rev. Immunol.**, Cambridge, v. 2, n° 1, p. 46-53, Jan., 2002.

GRAS, L.; GILBERT, R. E.; WALLON, M.; PEYRON, F.; CORTINA-BORJA, M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. **Epidemiol. Infect.**, London, v. 132, n° 3, p. 541-548, Jun., 2004.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, Stanford, v. 184, n° 5, p. 633-639, Sep., 2001.

GUDE, N. M.; ROBERTS, C. T.; KALIONIS, B.; KING, R. G. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb. Res.**, Carlton, v. 114, n° 5-6, p. 397-407, Jul., 2004.

GUERINA, N.; HSU, H.; MEISSNER, C.; MAGUIRE, J.; LYNFIELD, R.; STECHENBERG, B.; ABROMS, I.; PASTERNAK, M. S.; HOFF, R.; EATON, R. B.; GRADY, G. F. Neonatal

serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 330, n° 26, p. 1858-1863, Jun., 1994.

GULLER, S.; MA, Y.; RUNIC, R.; LACHAPELLE, L.; SALAFIA, C. M.; LOCKWOOD, C. J. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -mediated regulation of Fas ligand (FasL) expression in human cytotrophoblasts: a potential role in placental immune privilege. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 5, p.126, 1998.

HAFID, J.; VINCENT, N.; FLORI, P.; BELLETE, B.; RABERIN, H.; SUNG, R. T. M. Production of antibodies in murine mucosal immunization with *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. **Vet. Parasitol.**, Paris, v. 128, n° 1-2, p. 23-28, Mar., 2005.

HANNA, N.; BONIFACIO, L.; WEINBERGER, B.; REDDY, P.; MURPHY, S.; ROMERO, R.; SHARMA, S. Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New Brunswick, v. 55, n° 1, p. 19-27, Jan., 2006.

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

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

HAYNES, M. K.; JACKSON, L. G.; TUAN, R. S.; SHEPLEY, K. J.; SMITH, J. B. Cytokine production in first trimester chorionic villi: detection of MRNAs and protein products in situ. **Cell. Immunol.**, Philadelphia, v. 151, n° 2, p. 300-308, Oct., 1993.

HILL, J. A.; POLGAR, K.; ANDERSON, D. J. T helper 1-type cellular immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortions. **J. Am. Med. Assoc.**, Boston, v. 273, n° 24, p. 1933-1958, Jun., 1995.

HISAEDA, H.; SAKAI, T.; ISHIKAWA, H.; MAEKAWA, Y.; YASUTOMO, K.; GOOD, R. A.; HIMENO, K. Heat shock protein 65 induced by  $\gamma\delta$  T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Tokushima, v. 159, n° 5, p. 2375-2381, 1997.

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, St. Louis, v. 35, n° 6, p. 1411-1414, Jun., 1997.

HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitol. Today.**, Montana, v. 4, n° 12, p. 340-347, Dec., 1988.

HUNTER, C. A.; CANDOLFI, E.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunol.**, Palo Alto, v. 84, n° 1, p. 16-20, Jan., 1995.

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.**, Palo Alto, v. 62, n° 7, p. 2818-2824, Jul., 1994.

JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. **Clin. Diag. Laboratory. Immunol.**, Belgium, v. 6, n° 1, p. 24-29, Jan., 1999.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, Stellenbosch, v. 46, p. 11-21, Feb., 1960.

JIANG, K.; CHEN, Y.; JARVIS, J. N. Soluble factors from LPS- and PHA-activated PBMC induce MAPK, Stat1 and Stat3 phosphorylation in primary cultures of human term placental trophoblasts: implications for infection and prematurity. **Placenta**, Oklahoma, artigo "in press", doi: 10.1016/j.placenta.2006.06.013, 2006.

JOKHI, P. P.; KING, A.; JOBINSKY, P. T.; LOKE, Y. W. Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trophoblast and uterine cells. **J. Reprod. Immunol.**, Cambridge, v. 26, n° 2, p. 147-164, Mar., 1994.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M.; McQUILLAN, G.; NAVIN, T.; McAULEY, J. B. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. **Am. J. Epidemiol.**, Atlanta, v. 154, n° 4, p. 357-365, Aug., 2001.<sup>b</sup>

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, Colorado, v. 56, n° 5, p. 296-305, May., 2001.<sup>a</sup>

JONES, R. L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J.; SALAMONSEN, L. A. TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, Clayton, v. 132, n° 2, p. 217-232, Aug., 2006.

JULIANO, P. B.; BLOTTA, M. H. S.; ALTEMANI, A. M. A. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. **Placenta**, Campinas, v. 27, n° 6-7, p. 750-757, Jun-Jul., 2006.

KASPER, L.; COURRET, N.; DARCHE, S.; LUANGSAY, S.; MENNECHET, F.; MINNS, L.; RACHINEL, N.; RONET, C.; BUZONI-GATEL, D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Int. J. Parasitol.**, Paris, v. 34, n° 3, p. 401-409, Mar., 2004.

KELLY, R. W.; CRITCHLEY, H. O. D. A T helper-2 bias in decidua: the prostaglandin contribution of the macrophage and trophoblast. **J. Reprod. Immunol.**, Edinburgh, v. 33, n° 3, p. 181-187, Jul., 1997.

KHAN, I. A.; KASPER, L. H. IL-15 augments CD8+ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J. Immunol.**, Hanover, v. 157, n° 5, p. 2103-2108, Sep., 1996.

KIESCHNICK, H.; WAKEFIELD, T.; NARDUCCI, C. A.; BECKERS, C. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v. 276, n° 15, p. 12369-12377, Apr., 2001.

KIM, J. M.; OH, Y. K.; KIM, Y. J.; CHO, S. J.; AHN, M. H.; CHO, Y. J. Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Parasitol. Res.**, Seoul, v. 87, n° 9, p. 758-763, Sep., 2001.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int. J. Parasitol.**, Nova York, v. 34, n° 3, p. 423-432, Mar., 2004.

KING, A.; ALLAN, D. S. J.; BOWEN, M.; POWIS, S. J.; JOSEPH, S.; VERMA, S.; HIBY, S. E.; McMICHAEL, A. J.; LOKE, Y. W.; BRAUD, V. M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptor on decidual NK-cells. **Eur. J. Immunol.**, Cambridge, v. 30, n° 6, p. 1623-1631, Jun., 2000.

KING, A.; JOKHI, P. P.; SMITH, S. K.; SHARKEY, A. M.; LOKE, Y. W. Screening for cytokine mRNA in human villous and extravillous trophoblasts using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Cytokine**, Cambridge, v. 7, n° 4, p. 364-371, May., 1995.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am. J. Med.**, New Haven, v. 118, n° 3, p. 212-216, Mar., 2005.

LABARRERE, C. A.; FAULK, W. P. MHC class II reactivity of human villous trophoblast in chronic inflammation of unestablished etiology. **Transplantation**, Indianapolis, v. 50, n° 5, p. 812-816, Nov., 1990.

LANG, C.; GROB, U.; LÜDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, Göttingen, artigo "in press", doi: 10.1007/s00436-006-0306-9, 2006.

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J. J.; RUTSCHMAN, R. L.; MURRAY, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. **J. Immunol.**, Memphis, v. 169, n° 5, p. 2253-2263, Sep., 2002.

LANGERMANS, J. A. M.; NIBBERING, P. H.; VAN VUREN-VAN DER HULST, M. E. B.; FURTH, R. V. Transforming growth factor- $\beta$  suppress interferon- $\gamma$ -induced toxoplasmatatic activity in murine macrophages by inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production. **Parasite. Immunol.**, Netherlands, v. 23, p. 169-175, Nov., 2001.

LEONARD, M. O.; HANNAN, K.; BURNE, M. J.; LAPPIN, D. W.; DORAN, P.; COLEMAN, P.; STENSON, C.; TAYLOR, C. T.; DANIELS, F.; GODSON, C.; PETASIS, N. A.; RABB, H.; BRADY, H. R. 15-Epi-16-(para-fluorophenoxy)-lipoxin A(4)-methyl ester, a synthetic analogue of 15-epi-lipoxin a(4), is protective in experimental ischemic acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Dublin, v. 13, n° 6, p. 1657-1662, Jun., 2002.

LEPAGE, A. C.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. T.; KASPER, L. H. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Hanover, v. 161, n° 9, p. 4902-4908, Nov., 1998.

LETSCHER-BRU, V.; PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; FILISETTI, D.; ANTONI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; CONDOLFI, E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. **Infect. Immun.**, Strasbourg, v. 71, n° 11, p. 6615-6619, Nov., 2003.

LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Association of CD4<sup>+</sup> T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.**, Palo Alto, v. 184, n° 2, p. 597-607, Aug., 1996.

LIN, H.; MOSMANN, T. R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPIPAT, S.; WEGMANN, T. G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **J. Immunol.**, Alberta, v. 151, n° 9, p. 4562-4573, Nov., 1993.

LOURENÇO, E. V.; PEREIRA, S. R.; FACA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A.; MINEO, J. R.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GREENE, L. J.; PANUNTO-CASTELO, A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. **Glycobiology**, Ribeirão Preto, v. 11, n° 7, p. 541-547, Jul., 2001.

LÜDER, C. G. K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROSS, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **Int. J. Parasitol.**, Göttingen, v. 33, n° 8, p. 833-844, Jul., 2003.

LÜDER, C. G. K.; LANG, T.; BEUERLE, B.; GROSS, U. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. **Clin. Exp. Immunol.**, Wurzburg, v. 112, n° 2, p. 308-316, May., 1998.

LÜDER, C. G. K.; WALTER, W.; BEUERLE, B.; MAEURER, M. J.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1 $\alpha$ . **Eur. J. Immunol.**, Göttingen, v. 31, n° 5, p. 1475-1484, May., 2001.

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, Pittsburgh, v. 21, n° 24, p. 3352-3357, Jul., 2003.

LYCKE, E.; CARBERG, K.; NORRBY, R. Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host-cell: function of the penetration enhancing factor *Toxoplasma*. **Infect. Immun.**, Göteborg, v. 11, n° 4, p. 853-861, Apr., 1975.

McCABE, R. E.; LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, Stanford, v. 150, n° 6, p. 961-962, Dec., 1984.

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

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

MOORE, K. W.; WALL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Ann. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 19, p. 683-765, Apr., 2001.

MORAES-PINTO, M. I.; VINCE, G. S.; FLANAGAN, B. F.; HART, C. A.; JOHNSON, P. M. Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes. **Immunology**, São Paulo, v. 90, n° 1, p. 87-94, Jan., 1997.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets. **Immunol. Today.**, Alberta, v. 17, n° 3, p. 138-146, Mar., 1996.

MOUZON, S. H.; GUERRE-MILLO, M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. **Placenta**, Cleveland, v. 27, n° 8, p. 794-798, Aug., 2006.

NAGINENI, C. N.; DETRICK, B.; HOOKS, J. J. Transforming growth factor- $\beta$  expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: a possible role in the

immunopathogenesis of retinochoroiditis. **Clin. Exp. Immunol.**, Bethesda, v. 128, n° 2, p. 372-378, May., 2002.

NEURATH, M. F.; WEIGMANN, B.; FINOTTO, S.; GLICKMAN, J.; NIEUWENHUIS, E.; IJIMA, H.; MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; MUDTER, J.; GALLE, P. R.; BHAN, A.; AUTSCHBACH, F.; SULLIVAN, B. M.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H.; BLUMBERG, R. S. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. **J. Exp. Med.**, Mainz, v. 195, n° 9, p. 1129-1143, May., 2002.

NICKDEL, M. B.; ROBERTS, F.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C. W. Counter-protective role for interleukin-5 during acute *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.**, Glasgow, v. 69, n° 2, p. 1044-1052, Feb., 2001.

NTRIVALAS, E.; KWAK-KIM, J.; BEAMAN, K.; MANTOUVALOS, H.; GILMAN-SACHS, A. An in vitro coculture model to study cytokine profiles of natural killer cells during maternal immune cell-trophoblast interactions. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, Chicago, v. 13, n° 3, p. 196-202, Apr., 2006.

OLIVEIRA, J. G. **Influência do interferon- $\gamma$  na susceptibilidade de linhagem de células de coriocarcinoma humano (BeWo) frente à infecção por *Toxoplasma gondii*.** 2005. 126f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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

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

PATTILLO, R. A.; HUSSA, R. O.; RUCKERT, A. C.; KURTZ, J. W.; CADE, J. M.; RINKE, M. L. Human chorionic gonadotropin in BeWo trophoblast cells after 12 years in continuous culture: retention of intact human chorionic gonadotropin secretion in mechanically versus enzyme-dispersed cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 105, n° 4, p. 967-974, 1979.

PEREZ DE LEMA, G.; MAIER, H.; NIETO, E.; VIELHAUER, V.; LUCKOW, B.; MAMPASO, F.; SCHLONDORFF, D. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Munich, v. 12, n° 7, p. 1369-1382, Jul., 2001.

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 oxide production and polyamine biosynthesis. **Int. J. Parasitol.**, Strasbourg, v. 35, n° 14, p. 1569-1576, Dec., 2005.<sup>b</sup>

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

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

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

PINON, J. M.; DUMON, H.; CHEMLA, C.; FRANCK, J.; PETERSEN, E.; LEBECH, M.; ZUFFEREY, J.; BESSIERES, M. H.; MARTY, P.; HOLLIMAN, R.; JOHNSON, J.; LUYASU, V.; LECOLIER, B.; GUY, E.; JOYNSON, D. H.; DECOSTER, A.; ENDERS, G.; PELLOUX, H.; CANDOLFI, E. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of

immunoglobulin G, M, and A antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, Reims, v. 39, n° 6, p. 2267-2271, Jun., 2001.

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

PLUM, J.; DE SMEDT, M.; LECLERCQ, G.; VANDEKERCKHOVE, B. Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. **J. Immunol.**, Belgium, v. 154, n° 11, p. 5789-5798, Jun., 1995.

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

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

REDLINE, R. W.; LU, C. Y. Specific defects in the anti-listerial immune response in discrete regions of the murine uterus and placenta account for susceptibility to infection. **J. Immunol.**, Boston, v. 140, n° 11, p. 3947-3955, Jun., 1988.

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

REY, L. **Parasitologia**. 3° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001. 856p.

ROBERTSON, S. A.; INGMAN, W. V.; O'LEARY, S.; SHARKEY, D. J.; TREMELLEN, K. P. Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. **J. Reprod. Immunol.**, Adelaide, v. 57, n° 1-2, Oct-Nov., 2002.

ROTH, I.; CORRY, D. B.; LOCKSLEY, R. M.; ABRAMS, J. S.; LITTON, M. J.; FISHER, S. J. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. **J. Exp. Med.**, San Francisco, v. 184 n° 2, p. 539-548, Aug., 1996.

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

RUSSEL, D. G. Host cell invasion by Apicomplexa: an expression of the parasite's contractile system? **Parasitology**, Nova York, v. 87, n° 2, p. 199-209, Oct., 1983.

SACKS, G. P.; CLOVER, L. M.; BAINBRIDGE, D. R. J.; REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Flow cytometric measurement of intracellular Th1 and Th2 cytokine production by human villous and extravillous cytotrophoblast. **Placenta**, Oxford, v. 22, n° 6, p. 550-559, Jul., 2001.

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

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, Vienna, v. 75, n 1-2, p. 73-94, Jan., 2003.

SCHALDACH, C. M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, Califórnia, v. 38, n° 23, p. 7594-7600, Jun., 1999.

SCHMITT, E.; HOEHN, P.; HUELS, C.; GOEDERT, S.; PALM, N.; RUDE, E.; GERMANN, T. T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, Mainz, v. 24, n° 4, p. 793-798, Apr., 1994.

SHAPIRA, S.; HARB, O. S.; MARGARIT, J.; MATRAJT, M.; HAN, J.; HOFFMANN, A.; FREEDMAN, B.; MAY, M. J.; ROOS, D. S.; HUNTER, C. A. Initiation and termination of NF- $\kappa$ B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Cell. Sci.**, Philadelphia, v. 118, n° 15, p. 3501-3508, Aug., 2005.

SHEN, Y.; SCHLESSINGER, K.; ZHU, X.; MEFFRE, E.; QUIMBY, F.; LEVY, D. E.; DARNELL, J. E. Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. **Mol. Cell Biol.**, Nova York, v. 24, n° 1, p. 407-419, Jan., 2004.

SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E. J.; BERZOFSKY, J. A.; MOSMANN, T. R.; JAMES, S. L.; MORSE, H. C. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol. Rev.**, Bethesda, v. 127, p. 183-204, Jun., 1992.

SHRESTHA, S. P.; TOMITA, T.; WEISS, L. M.; ORLOFSKY, A. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. **Int. J. Parasitol.**, Nova York, v. 36, n° 4, p. 433-441, Apr., 2006.

SHRIKANT, P.; CHUNG, I. Y.; BALLESTAS, M. E.; BENVENISTE, E. N. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. **J. Neuroimmunol.**, Birmingham, v. 51, n° 2, p. 209-220, May., 1994.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, St. Louis, v. 304, n° 5668, p. 248-253, Apr., 2004.

SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; FUKUTOM, Y.; KRAHENBUHL, J. L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers antitoxoplasmal activity of IFN- $\gamma$  primed macrophages. **J. Immunol.**, Carville, v. 147, n° 7, p. 2340-2345, Oct., 1991.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor (TGF- $\beta$ ). **J. Exp. Med.**, Washington, v. 174, n° 3, p. 539-545, Sep., 1991.

SILVA, L. A.; VIEIRA, R. S.; SERAFINI, L. N.; JUNIOR, C. G. C.; FIGUEIREDO, J. F. C. Toxoplasmose do sistema nervoso central em paciente sem evidência de imunossupressão: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Ribeirão Pedro, v. 34, n° 5, p. 487-490, Set-Out., 2001.

SIMON, C.; FRANCES, A.; PIQUETTE, G.; HENDRICKSON, M.; MILKI, A.; POLAN, M. L. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Stanford, v. 78, n° 4, p. 847-854, Apr., 1994.

SIMPSON, H.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N.; BARBER, A.; LYALL, F. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. **Placenta**, Newcastle-upon-Tyne, v. 23, n° 1, p. 44-58, Jan., 2002.

SINAI, A. P.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. **J. Cell. Biol.**, New Haven, v. 154, n° 1, p. 95-108, Jul., 2001.

SINAI, A. P.; WEBSTER, 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.**, New Haven, v. 110, n° 17, p. 2117-2128, Sep., 1997.

SOMERSET, D. A.; ZHENG, Y.; KILBY, M. D.; SANSOM, D. M.; DRAYSON, M. T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology**, Birmingham, v. 112, n° 1, p. 38-43, May., 2004.

STEINBORN, A.; VON GALL, C.; HILDENBRAND, R.; STUTTE, H. J.; KAUFMANN, M. Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. **Obstet. Gynecol.**, Frankfurt, v. 91, n° 3, p. 329-335, Mar., 1998.

SUBAUSTE, C. S.; CHUNG, J. Y.; KONIARIS, A. H.; HUNTER, C. A.; MONTOYA, J. G.; PORCELLI, S.; REMINGTON, J. S. Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma-delta T cells in response to *Toxoplasma gondii in vitro* and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. **J. Clin. Invest.**, Palo Alto, v. 96, n° 1, p. 610-619, Jul., 1995.

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

SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L. E.; LIESENFELD, O.; FORT, M.; KANG, H.; GUFWOLI, E. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, Stanford, v. 164, n° 10, p. 5375-5382, May., 2000.

SVENSSON, L.; ARVOLA, M.; SALLSTROM, M. A.; HOLMDAHL, R.; MATTSSON, R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. **J. Reprod. Immunol.**, Lund, v. 51, n° 1, p. 3-7, Jul., 2001.

SZEKERES-BARTHO, J.; CHAOUAT, G. Lymphocyte-derived progesterone-induced blocking factor corrects resorption in a murine abortion system. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Pecs, v. 23, n° 1, p. 26-28, May., 1990.

TAKAHASHI, E. E. H.; ROSSI, C. L. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, Campinas, v. 39, n° 6, p. 327-331, Nov-Dec., 1997.

TAKEUCHI, M.; ALARD, P.; STREILEIN, J. W. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. **J. Immunol.**, Boston, v. 160, n° 4, p. 1589-1597, Feb., 1998.

TANGRI, S.; RAGHUPATHY, R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. **Biol. Reprod.**, New Delhi, v. 49, n° 4, p. 850-856, Oct., 1993.

THOUVENIN, M.; CANDOLFI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; KIEN, T. Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. **Parassitologia**, Strasbourg, v. 39, n° 4, p. 279-283, Dec., 1997.

TRAUTMAN, M. S.; COLLMER, D.; EDWIN, S. S.; WHITE, W.; MITCHELL, M. D.; DUDLEY, D. J. Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, Salt Lake, v. 4, n° 5, p. 247-253, Sep-Oct., 1997.

TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, St. Louis, v. 90, n° 8, p. 3725-3729, Apr., 1993.

VAN DEN ELSEN, P. J.; VAN DER STOEP, N.; VIETOR, H. E.; WILSON, L.; VAN ZUTPHEN, M.; GOBIN, S. J. P. Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN- $\gamma$ -inducible promoter (PIV) of CIITA. **Hum. Immunol.**, Leiden, v. 61, n° 9, p. 850-862, Sep., 2000.

VAN DER ENDE, A.; DU MAINE, A.; SCHWARTZ, A. L.; STROUS, G. J. Modulation of transferrin-receptor activity and recycling after induced differentiation of BeWo choriocarcinoma cells. **Biochem. J.**, Netherlands, v. 270, n° 2, p. 451-457, Sep., 1990.

VERMA, S.; HIBY, S. E.; LOKE, Y. W.; KING, A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biol. Reprod.**, Cambridge, v. 62, n° 4, p. 959-968, Apr., 2000.

VIGANO, P.; GAFFURI, B.; SOMIGLIANA, E.; INFANTINO, M.; VIGNALI, M.; DI BLASIO, A. M. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon- $\gamma$ . **Mol. Hum. Reprod.**, Milan, v. 7, n° 10, p. 971-977, Oct., 2001.

VINCE, G.; SHORTER, S.; STARKEY, P.; HUMPHREYS, J.; CLOVER, L.; WILKINS, T.; SARGENT, I.; REDMAN, C. Localization of tumor necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 88, n° 1, p. 174-180, Apr., 1992.

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K.; SIMPSON, R.; HOLFELS, E.; HOPKINS, J.; MACK, D.; METZ, M. B.; SWISHER, C. N.; PATEL, D.; ROIZEN, N.; STEIN, L.; WITHERS, S.; MUI, E.; EGWUAGU, C.; REMINGTON, J. S.; DORFMAN, R.; McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 23, n° 5, p. 1055-1060, Nov., 1996.

XIAO, J.; GARCIA-LLORET, M.; WINKLER-LOWEN, B.; MILLER, R.; SIMPSON, K.; GUILBERT, L. J. ICAM-1-mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblasts: implications for placental villitis. **Am. J. Pathol.**, Alberta, v. 150, n° 5, p. 1845-1860, May., 1997.

XING, C. Y.; GUI, S. Q. Regulation of vitality and IL-10 receptor expression of human decidual stromal cells in early pregnancy by IL-10, IFN-gamma. **Fen. Zi. Xi. Bao. Sheng. Wu. Xue. Bao.**, Shanghai, v. 39, n° 2, p. 111-117, Apr., 2006.

WALL, M. R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an immunoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, Palo Alto, v. 174, n° 5, p. 1209-1220, Nov., 1991.

WAN, K. L.; CARRUTHERS, V. B.; SIBELY, L. D.; AJIOKA, J. W. Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, St. Louis, v. 84, n° 2, p. 203-214, Feb., 1997.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T(H)2 phenomenon? **Immunol. Today.**, Edmonton, v. 14, n° 7, p. 353-356, Jul., 1993.

WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E. R.; FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WACHTER, H. Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. **Biochem. Biophys. Acta.**, Innsbruck, v. 1012, n° 2, p. 140-147, Jul., 1989.

WILLE, U.; NISHI, M.; LIEBERMAN, L.; WILSON, E. H.; ROOS, D. S.; HUNTER, C. A. IL-10 is not required to prevent immune hyperactivity during memory responses to *Toxoplasma gondii*. **Parasite. Immunol.**, Philadelphia, v. 26, n° 5, p. 229-236, May., 2004.

YAN, X.; WU XIAO, C.; SUN, M.; TSANG, B. K.; GIBB, W. Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta. **Biol. Reprod.**, Ontario, v. 66, n° 6, p. 1667-1671, Jun., 2002.

YOON, B. H.; ROMERO, R.; PARK, J. S.; KIM, M.; OH, S. Y.; KIM, C. J.; JUN, J. K. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Korea, v. 183, n° 5, p. 1124-1129, Nov., 2000.

ZENCLUSSEN, A. C. Regulatory T cells in pregnancy. **Semin. Immunol.**, Berlim, v. 28, n° 1, p. 31-39, Aug., 2006.

ZHANG, B. B.; JIAO, Y. W.; CAI, W. M.; TAO, J.; LIU, R. H. Influence of interferon gamma treatment on expression of TGF-beta1 and its receptors in liver fibrosis of mice with schistosomiasis japonica. **Zhongguo. Ji. Sheng. Chong. Xue. Yu. Ji. Sheng. Chong. Bing. Za. Zhi.**, Hangzhou, v. 22, n° 6, p. 340-343, Dec., 2004.

ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.**, Nova York, v. 67, n° 9, p. 4383-4392, Sep., 1999.

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