

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

**Papel de MIF (Fator de Inibição de Migração de Macrófagos) na
proteção de células trofoblásticas (BeWo) e explantes placentários de
terceiro trimestre contra infecção por *Toxoplasma gondii***

Angelica de Oliveira Gomes

Uberlândia
Julho - 2008

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

**Papel de MIF (Fator de Inibição de Migração de Macrófagos) na
proteção de células trofoblásticas (BeWo) e explantes placentários de
terceiro trimestre contra infecção por *Toxoplasma gondii***

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

Mestranda: Angelica de Oliveira Gomes

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro

Co-orientador: José Roberto Mineo

Uberlândia
Julho -2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- G633p Gomes, Angelica de Oliveira, 1982-
Papel de MIF (Fator de Inibição de Migração de Macrófagos) na proteção de células trofoblásticas (BeWo) e explantes de terceiro trimestre contra infecção por *Toxoplasma gondii* / Angelica de Oliveira Gomes. - 2008.
80 f. : il.
Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.
Co-orientador: José Roberto Mineo.
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 , Eloisa Amália Vieira. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.993.1

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe, Veronice de Oliveira Gomes, pessoa fundamental em minha vida. Que está presente em todos os momentos. Pessoa que sofre com as minhas angustias e vibra com as minhas conquistas, participando diretamente de cada uma delas.

*Você mamãe foi fundamental para esta vitória.
Te amo demais!! Obrigada por tudo!!*

Agradecimento Especial

*À minha orientadora Eloisa Amália Vieira Ferro,
Obrigada*

Pelo carinho e amizade!!

Pelo convívio tão agradável!

Por sua infalível presença!

Pela preocupação e incentivos!

Por guiar os meus passos!!

Obrigada

Pela sua postura de confiança e determinação!!

Pelos inúmeros ensinamentos durante cada ano de convivência!

E por ter me presenteado com a idéia deste projeto!!

Meu eterno agradecimento e admiração!!!

Agradecimentos

Ao meu co-orientador José Roberto Mineo, primeiramente por ter aberto as portas do laboratório de Imunologia, me acolhendo e permitindo que grande parte deste trabalho fosse realizado. Por inúmeros ensinamentos ao longo de todo o curso de pós graduação. E acima de tudo pela oportunidade de assistir cada uma de suas brilhantes aulas. Me espelharei muito em seus ensinamentos ao longo de minha vida!

A Deise Aparecida de Oliveira Silva, pelo acolhimento no laboratório de Imunologia, pela participação direta neste trabalho, pela disposição e boa vontade em ensinar e ajudar, por ser um exemplo de pessoa a ser seguido. Obrigada por você fazer parte de minha formação!

As demais pessoas do laboratório de Imunologia que contribuíram imensamente para realização deste trabalho: Ana Cláudia Pajuaba, Dona Zilda e Marley. Muito obrigada por tudo: Pelas pipetas, pelos meios de cultura, pelos parasitos... Obrigada pela amizade, pelo sorriso, pela atenção de cada um de vocês. Em especial ao Damaso Pacheco, pessoa de coração enorme, sempre disposta a ajudar a todos. Muito obrigada pela companhia durante toda esta caminhada. Companheiro de salvar células debaixo de chuva, do terceiro turno no laboratório, dos apertos, das conquistas!! Obrigada pela sua amizade.

À cada professor do laboratório de histologia, em especial, à Professora Neide Maria da Silva por ser um exemplo de compromisso e dedicação! Por me permitir vibrar com suas brilhantes idéias de pesquisadora, por fazer parte deste laboratório e contribuir imensamente para que tenhamos melhores condições de trabalho e oportunidades de fazermos coisas importantes. E ao professor Marcos Silva pelo carinho e por ter participado da minha iniciação à pesquisa.

Às amigas da Histologia::

Mariana e Idessânia, por todos os momentos que passamos juntas, por dividirmos alegrias, angustias, trabalho, conhecimentos e diversão;

Bellisa e Priscila pela participação direta neste trabalho. Obrigada pela ajuda para coletar placentas, pela companhia até nos finais de semana, por me socorrerem todas as vezes que precisei. Muito obrigada pelo carinho, pela amizade sincera, pela boa vontade em ajudar. Muito obrigada por tudo!!

Léticia pessoa tão especial que acompanhou e vibrou com cada etapa deste trabalho. Obrigada por sua ajuda e pela agradável companhia!

Ao ex-técnico do laboratório de histologia, Richard Atila, obrigada pela amizade, pelas ajudas, ensinamentos. Sentirei saudades de você!

Obrigada a toda a equipe do hospital a Dra Maria Célia dos Santos, tão importante nesta parceria de trabalho. E a cada pessoa que permitiu que este trabalho fosse realizado: Aderi, Cássia, Mary Ângela e inúmeras outras pessoas representadas pelos poucos nomes citados. Sem a boa vontade que cada uma de vocês este trabalho não seria possível.

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

A minha família, pessoas tão especiais que indiretamente fazem parte deste trabalho. Meu pai Carlos Roberto e minha mãe Veronice e minhas irmãzinhas queridas Christiane e Carla. Obrigada pelo amor, carinho, compreensão e apoio que recebo de vocês.

Aos secretários da pós graduação Lucileide, Lucélia e ao Neto (ex-funcionário) muito obrigada pelo carinho, atenção e boa vontade com que recebem e atendem a cada aluno.

Ao apoio financeiro da FAPMIG, CAPES e CNPq

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF).....	11
1.1.1 Modo de ação de MIF.....	12
1.1.2 MIF na imunidade inata e adaptativa.....	13
1.1.3 MIF em órgãos reprodutivos e na gestação.....	14
1.1.4 Papel de MIF na infecção parasitária.....	15
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	16
1.2.1 Interação parasito- hospedeiro.....	17
1.2.2 Resposta Imunológica à infecção por <i>T. gondii</i>	17
1.2.3 Modulação da resposta imunológica durante a infecção por <i>T. gondii</i>	19
1.2.4 Toxoplasmose na gestação.....	21
1.3 A Placenta.....	26
1.3.1 O trofoblasto.....	26
1.3.2 Explantes Placentários e Células de linhagem BeWo.....	27
2. JUSTIFICATIVA:.....	30
3. OBJETIVO:.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Amostras de Placentas.....	32
4.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	32
4.3 Produção de Antígeno Solúvel de taquizoítas (STAg).....	32
4.4 Cultura de células, tratamento e infecção.....	33
4.5 Cultura de explantes de vilos coriônicos humanos, tratamento e infecção..	34
4.6 Análise Morfológica.....	34
4.7 Imuno-histoquímica.....	35
4.8 Ensaio de ELISA.....	36
4.9 Dosagem de NO.....	36
4.10 Concentração protéica.....	37
4.11 Análise estatística.....	37

5.	RESULTADOS	38
5.1	Produção de MIF em células trofoblásticas de linhagem BeWo	38
5.2	Efeito de MIF no controle da replicação intracelular de <i>T. gondii</i>	38
5.3	Efeito de MIF no controle do índice de infecção por <i>T. gondii</i>	39
5.4	Análise Morfológica de explantes placentários.....	39
5.5	A produção de MIF em explantes placentários de terceiro trimestre não é aumentada devido à infecção por <i>T. gondii</i>	40
5.6	Produção de Óxido Nítrico	41
6.	DISCUSSÃO	42
7.	CONCLUSÕES.....	49
8.	ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO livre E ESCLARECIDO	50
9.	ANEXO II: parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP-UFU).....	52
10.	FIGURAS	53
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

O Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) desempenha inúmeras funções no organismo. Suas funções imunológicas incluem a modulação da resposta de hospedeiros a patógenos. Diferente de outras citocinas, MIF é induzida na presença de glicocorticóides, vencendo a atividade imunossupressora destes hormônios. O objetivo deste estudo foi verificar a função de MIF na proteção de células trofoblásticas (BeWo) – como modelo experimental de primeiro trimestre de gestação e explantes placentários de terceiro trimestre contra infecção por *Toxoplasma gondii*. Para este propósito células BeWo foram incubadas em meio de cultura tratados ou não com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), rMIF, anticorpo policlonal anti-MIF, sobrenadantes de cultura celular (SPN), ou SPN adicionado de anti-MIF. Posteriormente, as células foram infectadas ou não por *T. gondii* e incubadas novamente com os mesmos estímulos. Sobrenadantes de cultura de células BeWo foram utilizados para dosagem da produção de MIF por ensaio ELISA. Células BeWo foram fixadas e coradas para determinar a replicação de parasitos e o índice de infecção. Além disso, explantes de placentas foram coletados, estimulados ou não com STAg e infectados ou não com *T. gondii*. Os explantes foram processados para a análise morfológica, Imuno-histoquímica e sobrenadantes foram analisados por ELISA para quantificar a produção de MIF. Resultados mostraram que a produção de MIF foi aumentada em sobrenadantes de células BeWo estimuladas com STAg e em células infectadas com *T. gondii* em comparação com células não infectadas. Entretanto, estes resultados não foram observados em explantes de placenta de terceiro trimestre. O índice de infecção e replicação de *T. gondii* em células BeWo aumentou com o bloqueio de MIF endógeno e diminuiu na presença de MIF exógeno. Então, nós concluímos que MIF é um importante fator no controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas de linhagem BeWo. E que a ausência de regulação positiva de MIF frente à infecção em explantes de terceiro trimestre pode ter relação com a maior suscetibilidade à infecção nesta fase gestacional.

Palavras chave: BeWo, explantes placentários, MIF, *T. gondii*

ABSTRACT

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) performs various roles. Its immunological functions include the modulation of the host response to pathogens. In contrast to other known cytokines, MIF production is induced rather than suppressed by glucocorticoids, and MIF has been found to override the immunosuppressive effects of glucocorticoids. The aim of this study was to verify the role of MIF on the defense of trophoblastic cells (BeWo) – like a experimental model of first trimester of pregnancy and placental explants of third trimester against infection by *Toxoplasma gondii*. For this purpose, BeWo cells were incubated in culture medium treated or not with STAg, rMIF, anti-MIF, supernatants of cultured cells (SPN) pre stimulated for MIF production, or SPN plus anti-MIF. Followed by infection or sham-infection with *T. gondii* the cells were again incubated in the presence of the same stimulus. Supernatants of BeWo cells were assessed for MIF production. BeWo cells were processed to measure replication of parasites and index of infection and for immunocytochemistry assay. In addition, placental explants were stimulated or not with STAg and infected or not with *T. gondii*. Explants were processed for morphologic and immunohistochemistry analyses and supernatants were accessed for MIF production. Results showed that MIF is increased in supernatants of cultured BeWo cells infected with *T. gondii* or stimulated with STAg compared with non infected cells. However, it wasn't observed for placental explants. The index of infection and replication of parasites increased with blockade of endogenous MIF and reduced in presence of exogenous MIF in BeWo cells. Thus, we conclude that MIF is an important factor in control of *T. gondii* infection in BeWo trophoblastic cells. The lack up regulation of MIF by infection in third trimester placental explants may have relationship with the more susceptible to infection at this gestational age.

Key words: BeWo, placental explants, MIF, *T. gondii*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF)

Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) é uma citocina descrita por David (1966); Blomm e Bennett (1966), que a identificaram como um fator produzido por linfócitos associado com a inibição de migração randômica de macrófagos durante resposta de hipersensibilidade tardia. Entretanto, a importância desta citocina foi negligenciada por muito tempo, por falta de compreensão das atividades biológicas de MIF. Estas funções começaram a ser esclarecidas a partir de 1989 com a clonagem do DNA complementar de MIF humano (Weiser, et al., 1989), entretanto, o progresso foi pequeno devido à dificuldade de se conseguir a proteína recombinante pura.

Em 1991, a busca de novos reguladores da inflamação conduziu a "redescoberta" de MIF como uma molécula, similar a hormônio, liberada da hipófise em resposta a lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Bernhagem et al., 1993). As crescentes descobertas envolvendo esta citocina levaram ao maior interesse em estudos.

Aos poucos foram sendo descobertas funções diversas e intrigantes de MIF no sistema imunológico. Isso levou a uma nova e menos formal definição para MIF: "o mais interessante fator" por Bucala (2000), segundo este autor, embora MIF tenha sido uma das primeiras citocinas descritas, deverá se tornar uma das últimas a ser completamente entendida.

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

Inicialmente, acreditava-se que os linfócitos T eram a única fonte de MIF no sistema imunológico. Entretanto, hoje se sabe que macrófagos, monócitos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, basófilos também produzem MIF (Lue et al., 2002). Diferente de outras citocinas, MIF é constitutivamente expressa e estocada intracelularmente e não requer síntese *de novo* para ser secretada.

Além do sistema imunológico MIF apresenta ampla distribuição tecidual, pulmão, camada epitelial da pele, trato gastrintestinal e geniturinário. Apresenta também alta expressão em tecidos do sistema endócrino, principalmente, órgãos envolvidos na resposta ao estresse - hipotálamo, hipófise e glândula adrenal (Calandra et al., 1994).

1.1.1 Modo de ação de MIF

Leng e colaboradores (2003) registraram a identificação de CD74 - cadeia invariante associada ao MHC II (Complexo de Histocompatibilidade Principal) - como receptor para MIF. Estes autores registraram uma alta afinidade entre MIF e CD74 e o requerimento da expressão de CD74 para promover uma resposta celular mediada por MIF. As respostas celulares subsequentes a esta ligação são: sinalização regulada por quinase reguladora do sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) e por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Posteriormente, ocorre transdução de sinal, transcrição gênica, expressão de moléculas efetoras e replicação celular, ou seja, eventos pro-inflamatórios (Mitchell, et al., 1999).

MIF induz ativação de ERK1/2 dependente de proteína quinase A e está associada com o aumento da atividade enzimática da fosfolipase citoplasmática A2 (cPLA2). PLA2 é um importante "link" intracelular na ativação de cascata pro-inflamatória, resultando na produção de ácido araquidônico e posteriormente em prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrienos. PLA2 é também o alvo de efeitos anti-inflamatórios por glicocorticoides. Portanto, a indução de PLA2 via ERK1 e 2 é um dos mecanismos de ação de MIF para sobrepor o efeito imunossupressivo de glicocorticoides (Mitchell, et al., 1999).

Outro mecanismo pelo qual MIF pode atuar é por meio da ativação da via NF- κ B (Fator Nuclear-Kappa B), que é um fator transcricional envolvido na

regulação da expressão de muitos genes pro-inflamatórios incluindo citocinas, moléculas de adesão e ciclooxigenase (COX) (Mitchell, et al., 1999). Muitos estudos mostram que a ativação de NF-kB por MIF é um dos mecanismos para suprimir a atividade anti-inflamatória de glicocorticóides (Duan, Cannon, 2000).

MIF também atua como regulador negativo de p53, sendo um importante “link” de MIF com inflamação, crescimento celular e formação de tumores (Mitchell, Bucula, 2000). A inibição de p53 por MIF requer a ativação de ERK1/ERK2, PLA2, COX2 e PGE2.

1.1.2 MIF na imunidade inata e adaptativa

Inicialmente MIF foi classificada como uma citocina do sistema adaptativo, mas, atualmente emerge como uma citocina com funções predominantes na imunidade inata (Calandra, Roger, 2003). MIF é liberada de macrófagos quando estimulados por LPS, sendo também induzido por Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon gama (IFN γ). Após estímulo adequado, MIF é liberada em tecidos ou na circulação sistêmica, agindo como uma citocina pro-inflamatória clássica, promovendo a resposta imunológica inata e adaptativa por meio da ativação de macrófagos e linfócitos T (Calandra et al., 1994).

Na imunidade adaptativa MIF tem função de regular linfócitos T, secreção de interleucinas (IL) e produção de anticorpos devido à estimulação antigênica (Bacher et al., 1997).

Na resposta inata MIF desempenha função central na resposta a bactérias gram-positivas e gram-negativas (Bacher et al., 1997). MIF é constitutivamente expressa por macrófagos, com altos níveis de proteínas presentes inclusive em células em repouso (Calandra et al., 1994). Nestas células MIF atua aumentando a fagocitose (Onodera et al., 1997), destruindo parasitos (Junttner et al., 1998) e células tumorais (Pozzi, Weiser, 1992).

Estudos com células Natural Killer (NK) forneceu novas informações sobre a função de MIF na imunidade inata. Apte e colaboradores (1998) atentos em elucidar fatores responsáveis pelo privilégio imunológico no olho, encontraram que o humor aquoso possui proteínas que inibem a atividade citotóxica mediada

por células NK in vitro e identificaram que esta proteína era MIF. Demonstraram que MIF recombinante (rMIF) inibe a lise promovida por células NK de maneira dose-dependente, ou seja MIF reduz a exocitose de grânulos de perforina por células NK (Apte et al., 1998).

1.1.3 MIF em órgãos reprodutivos e na gestação

Existem fortes evidências do envolvimento de MIF em processos reprodutivos, principalmente processos envolvidos com reações inflamatórias tais como: ovulação (Wada et al., 1997), ciclo menstrual (Arcuri et al., 2001) e fase inicial da gestação (Arcuri et al., 1999).

MIF também foi detectado em ovário, oviduto e útero, principalmente no endométrio (Suzuki et al., 1996). A expressão de MIF no endométrio ocorre durante todo o ciclo menstrual, entretanto esta expressão varia em diferentes fases deste ciclo.

MIF já foi detectada no epitélio glandular e células decíduais de útero de primeiro trimestre e em células Nku (Natural Killer uterinas), a população de leucócito mais abundante no endométrio de primeiro trimestre (Arcuri et al., 2006).

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

Células mononucleares presentes no espaço intervilo produzem maior quantidade de MIF que células mononucleares de sangue periférico (Chaisavaneeyakorn et al., 2002). Aumento na produção de quimiocinas na placenta durante uma reação inflamatória contribui para que haja um acúmulo de macrófagos e monócitos no espaço intervilo (Suguitan et al., 2003, Pfaff et

al., 2005). Provavelmente o aumento nos níveis de MIF em sangue intervilo possa exercer importante papel na ativação de macrófagos, suprimindo ou minimizando o efeito imunossupressivo dos hormônios corticóides na placenta (Chaisavaneeyakorn et al., 2002).

Contudo, a atividade fisiológica exercida por MIF na gestação e em tecidos reprodutivos ainda não está totalmente esclarecida. MIF está presente em diferentes fases gestacionais, o que denota a importância desta citocina na gestação. Entretanto, MIF parece não ser essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação, uma vez que fêmeas MIF^{-/-} são férteis e os embriões têm desenvolvimento normal (Bozza et al., 1999).

1.1.4 Papel de MIF na infecção parasitária

MIF é liberado por macrófagos ativados por vários estímulos pró-inflamatórios tais como lipopolissacarídeos, síndrome de choque toxêmico por toxina 1, TNF- α e IFN- γ (Bernhagen et al., 1998; Martiney et al., 2000). MIF tem ainda a propriedade de ativar macrófagos e é capaz de promover a morte de parasitos intracelulares (Bernhagen et al., 1998). Isto se deve a capacidade de inibir a migração randômica de macrófagos sugerindo que estes se acumulem no local de atuação (Bernhagen et al., 1998), além de regular a atividade de células Natural Killer (NK) (Apte et al., 1998).

Assim, nível elevado de MIF pode ser patogênico por promover uma resposta inflamatória excessiva. Entretanto, em concentrações adequadas parece promover uma resposta inflamatória potente capaz de promover proteção contra doença grave para assegurar uma rápida e eficiente eliminação de parasitos, tais como *Plasmodium falciparum* (Chaisavaneeyakorn et al., 2002).

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

MIF exerce funções inflamatórias similares em organismos protozoários tais como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*. A infecção com estes parasitos em camundongos MIF^{-/-} leva a altos níveis de parasitemia e imunopatologia destes animais, mais uma vez demonstrando a importância de MIF no controle de infecções (Reyes et al., 2006; Jüttner et al., 1998).

Camundongos MIF^{-/-} também mostram-se mais susceptíveis a infecção por helmintos devido ao prejuízo da atividade de macrófagos (Rodrigues-Sosa et al., 2003).

Recentemente foi demonstrado que explantes placentários regulam positivamente a produção de MIF em resposta à estimulação com Antígeno Solúvel de *Toxoplasma gondii* - STAg (Ferro et al., 2008). Sugerindo potencial atividade de MIF contra infecção por *T. gondii* nestes tecidos placentários. Além disso, foi demonstrado recentemente que MIF é fundamental na resistência contra *T. gondii* uma vez que camundongos MIF^{-/-} apresentam maior suscetibilidade à infecção por estes parasitos (Flores et al., 2008).

1.2 *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, importante patógeno oportunista em diversos hospedeiros. É capaz de infectar uma ampla variedade de vertebrados, incluindo humanos. Isto justifica sua ampla distribuição e elevada soroprevalência. Sendo um dos mais abundantes parasitos eucariontes em humanos (Tenter et al.; 2000).

T. gondii faz parte do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e família Sarcocystidae (Rey, 2001).

O filo Apicomplexa compreende aproximadamente 5000 espécies (Nishi et al., 2008). As espécies que fazem parte deste filo possuem algumas características em comum. Apresentam um complexo apical de estruturas de citoesqueleto especializadas, além de organelas de secreção - roptrias e micronemas. As organelas secretoras juntamente com os grânulos densos são responsáveis pelo reconhecimento da célula hospedeira, além de fixação, invasão,

estabelecimento e manutenção do vacúolo parasitóforo (VP), dentro dos quais os parasitos residem (Carruthers, Sibley, 1997).

1.2.1 Interação parasito- hospedeiro

O balanço da interação entre *T. gondii* e seus hospedeiros intermediários é importante para tornar possível uma interação de longa duração. Esta capacidade maximiza a probabilidade de transmissão do parasito para o hospedeiro definitivo que compreende a família dos felídeos (Tenter, Heckeroth, Weiss, 2000).

Delicadas adaptações do parasito com o hospedeiro asseguram a sobrevivência do parasito sem induzir doença no hospedeiro. Estas adaptações envolvem evoluções de longas datas que capacitam o parasito não apenas obter nutrientes essenciais, mas também evadir da destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro (Lang, Grob, Carsten, 2007).

O balanço na interação parasito-hospedeiro, em indivíduos imunocompetentes, gera uma infecção assintomática ou então sintomas inespecíficos. Nestes indivíduos a resposta imunológica é capaz de restringir a replicação do parasito e evitar uma doença exacerbada. Entretanto, esta resposta não é capaz de eliminar o parasito (Lang, Grob, Carsten, 2007).

Assim um delicado balanço entre supressão e indução da resposta imunológica são aspectos importantes para garantir a sobrevivência do hospedeiro e, conseqüentemente, manter um ambiente propício para o desenvolvimento do parasito (Lang, Grob, Carsten, 2007).

1.2.2 Resposta Imunológica à infecção por *T. gondii*

O controle da infecção é o resultado de mecanismos complexos e compartimentalizados, e envolve elementos da resposta imune inata e adaptativa. A imunidade celular é considerada componente chave na resposta imune do hospedeiro, uma vez que é responsável pelo controle da replicação de *T. gondii* (Schluter et al., 1991). Anticorpos apresentam um papel secundário

como mecanismo protetor, mas é essencial para diagnóstico da toxoplasmose (Kang et al., 2000; Sayles et al., 2000).

Linfócitos T ativados são essenciais para o controle da fase aguda e crônica da toxoplasmose (Gazzinelli et al, 1991). Linfócitos T CD8⁺ desempenham a principal função efetora contra *T. gondii*, já que linfócitos T CD4⁺ são cruciais para regulação da resposta imunológica contra estes parasitos (Gazzinelli et al, 1991).

Subpopulações de linfócitos T1 e Th2 possuem diferentes padrões de produção de citocinas e papéis distintos na resposta imune. A interação funcional entre estas duas subpopulações celulares está esquematicamente representada na **figura 01** (Cutolo et al., 1998).

Células Th1 secretam IFN- γ , TNF- α e TNF- β e IL-2 que ativam reações mediadas por células. Células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecem a produção de anticorpos (Cherwinski et al., 1987).

Células Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias, ou seja, IL-10, um produto das células Th2, inibe o desenvolvimento das células Th1 (Vilcek, 1994). Portanto, IL-10 é uma citocina antiinflamatória que inibe funções importantes e essenciais para a ativação de linfócitos T; inibem a expressão de antígenos de histocompatibilidade de classe II em monócitos e também a expressão de CD23, dentre outras funções. Entretanto, o papel exato desta citocina no mecanismo de regulação negativa de produção de citocinas do perfil Th1 não está completamente esclarecido (Romagnani, 1991, Donnelly et al., 1995).

Macrófagos e células Natural Killer são a primeira linha de defesa contra o parasito durante a fase inicial da infecção (Sher et al., 1993, Gazzinelli et al., 1993). IL 12 - produzida por macrófagos, neutrófilos e especialmente por células dendríticas - é crucial para indução de uma resposta imunológica contra *T. gondii*, que resulta na diferenciação e expansão clonal de células de perfil Th1.

IFN γ é a principal citocina envolvida no controle da infecção por *T. gondii* (Suzuki et al., 1988). Isto leva a ativação células efetoras a controlar a replicação intracelular do parasito, ou eventualmente causa destruição de *T. gondii* (Yap, Sher, 1999). Portanto, IFN γ e outras citocinas, tais como TNF α , IL6 e IL1 têm

efeito sinérgico na indução de uma resposta imunológica adequada contra *T. gondii* (Sibley et al., 1991).

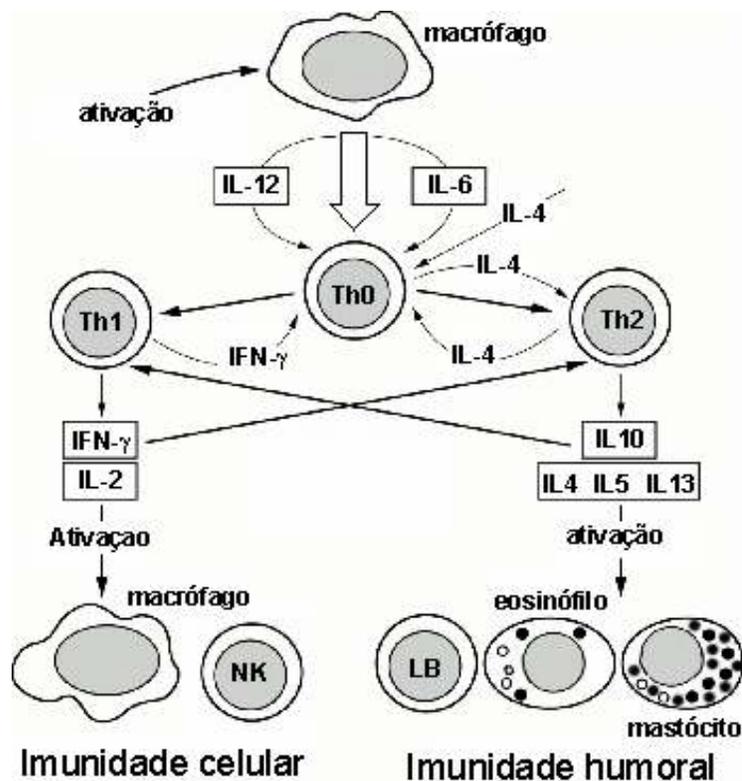


FIGURA 1. PAPEL DAS CITOCINAS TH1 E TH2 NA REGULAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL. NÍVEIS DE IL-6 SÃO CAPAZES DE POLARIZAR A DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+. NÍVEIS DE IL-12 POR SUA VEZ DESENCADEIAM A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TH1 (MODIFICADO DE CUTOLO ET AL., 1998).

1.2.3 Modulação da resposta imunológica durante a infecção por *T. gondii*

Uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro pode ser prejudicial tanto para o parasito, quanto para o hospedeiro. Assim, *T. gondii* desenvolveu uma série de interações com seu hospedeiro, modulando a resposta imunológica deste (Reis e Sousa et al., 1997).

T. gondii é capaz de modular a resposta imunológica por estimular citocinas pro e anti-inflamatórias. A secreção de IL-10 induzida por *T. gondii*, por exemplo, pode desativar macrófagos e, conseqüentemente, diminuir a atividade microbicida pela diminuição da produção de IFN γ . Desta forma facilita a sobrevivência intracelular do parasito (Bogdan, Nathan, 1993). Outras citocinas

de perfil antiinflamatório também são induzidas por *T. gondii*, tais como, $IFN\alpha/\beta$. A presença destas relacionam-se com produção reduzida de $IFN\gamma$ (Diez et al., 1989).

Entretanto, *T. gondii* não interfere na resposta do hospedeiro apenas induzindo a secreção de citocinas anti-inflamatórias. Pelo contrário, algumas condições adequadas tais como, infecção de macrófagos ou células dendríticas pré-ativadas são capazes de liberar IL-12 e $TNF\alpha$ (Reis e Sousa et al., 1997). Estas serão responsáveis por restringir o excesso de parasitos teciduais. Este processo contribui para sobrevivência do parasito no hospedeiro e ao mesmo tempo manter a infecção (Lang, Grob, Carsten, 2007).

Os mecanismos de *T. gondii* para inibir a secreção de citocinas pro-inflamatórias foram propostos recentemente. O parasito contrabalança citocinas pro-inflamatórias por interferência direta com as cascatas de sinalização da célula hospedeira. Dentre eles, a fosforilação do inibitor κB por I κB Kinase leva a dissociação do fator transcricional NF κB e degradação no proteassoma (Ghosh, Karin 2002). A ativação de NF- κB é crucial para a expressão de IL-12 e $TNF\alpha$. Portanto, na ausência da ativação deste fator tem-se inibição da resposta inflamatória. Outro mecanismo descrito é a fosforilação de Sinal de Tradução e Ativador de Transcrição 3 (STAT3) após infecção parasitária levando a uma interferência negativa na produção de IL-12 e $TNF\alpha$ (Butcher et al., 2005).

T. gondii também é capaz de evadir dos mecanismos antiparasitários efetores tais como liberação de $IFN\gamma$. Esta citocina é considerada o principal mediador da resistência contra *T. gondii* (Suzuki et al., 1988). Os mecanismos de inibição da atividade transcricional mediada por $IFN\gamma$ deve ser crucial para a habilidade do parasito de sobreviver intracelularmente e estabelecer uma infecção persistente (Lang et al., 2007).

Uma outra via de modulação por *T. gondii* envolve o controle da apoptose das células hospedeiras. A apoptose é crucial por regular a resposta imunológica (Krammer, 2000). Por ser *T. gondii* um parasito intracelular obrigatório é interessante que a célula hospedeira tenha uma viabilidade sustentada para possibilitar o desenvolvimento do parasito. Assim, *T. gondii* modula a apoptose

da célula hospedeira o que pode ser crítico para o curso da infecção (Luder, Gross, 2005). Interessantemente, *T. gondii* pode inibir ou desencadear a apoptose. Os mecanismos envolvidos ainda não estão bem esclarecidos mais eles envolvem a presença ou ausência de parasitos dentro da célula (Goebel et al., 1999) e a virulência do parasito (Gavrilescu, Denkers, 2001).

Inúmeros outros mecanismos envolvem a relação parasito hospedeiro e são importantes para promover o balanço entre proteção e inflamação de modo a permitir a sobrevivência do hospedeiro e permanência do parasito. Os mecanismos empregados pelo parasito para mediar uma evasão resulta na conversão do estágio de replicação rápida (taquizóitas) para um estágio potencialmente persistente (bradizoítas) (Lang, Grob, Carsten, 2007).

Cada um dos mecanismos acima citados são de crucial importância e a perda deste balanço pode levar à manifestações graves da doença. Tais condições são notadas em indivíduos imunocomprometidos (indivíduos positivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV+, ou sob o uso de drogas imunossupressoras). Nestes indivíduos a ausência de uma resposta imunológica adequada pode desencadear em formas graves da toxoplasmose. Estes indivíduos podem desenvolver quadros de manifestações neurológicas, distúrbios de nervos cranianos, anormalidades sensoriais até mesmo quadros psicóticos, assim como encefalite fatal (Montoya; Liesenfeld, 2004).

1.2.4 Toxoplasmose na gestação

A toxoplasmose também pode se manifestar em uma segunda condição imunossupressora - a gestação.

Durante a gestação, as funções fisiológicas maternas são bastante alteradas. Muitos hormônios, mais notavelmente estrógenos e progesterona, estão amplamente aumentados; esta condição gera alterações no balanço de citocinas de perfil Th1/Th2 (Roberts et al., 2001) com tendência a conversão para o perfil Th2 (Hanna et al., 2000). O domínio de um padrão de citocina Th2 durante a gestação está representado na **figura 2**. O papel fisiológico desta alteração é proteger o desenvolvimento do feto do sistema imunológico materno.

Já que, um padrão predominante de citocinas Th1, tais como: TNF- α , IFN- γ e IL-2 configuram um quadro potencialmente prejudicial para a gestação, podendo levar ao aborto (Daher et al., 2004; Raghupathy, 2001).

Assim, a influência hormonal no sistema imunológico para evitar a rejeição ao feto, acaba influenciando a potencialidade de infecção parasitária (Roberts et al., 2001).

A manutenção da gestação está mais relacionada à citocinas de perfil T helper 2 - Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) do que citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-2) (Wegmann et al., 1993). Contudo, há grande número de evidências demonstraram que a manutenção de diferentes etapas da gestação dependem do estabelecimento de um balanço entre citocinas pró e antiinflamatórias (Wegmann, 1984, Simon et al., 1998).

Assim, citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 têm papel fundamental durante o processo de implantação e parto, fenômenos estes correlacionados com uma transitória reação inflamatória local (Simon et al., 1998; Zourbas et al., 2001; Ietta et al., 2002); enquanto, citocinas com atividades antiinflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10) são de fundamental importância na manutenção da gestação.

Tal atividade está amplamente relacionada à secreção hormonal. Assim, a produção de elevados níveis de glicocorticóides, tais como cortisol (hormônio imunossupressivo encontrado em quantidades elevadas em mulheres grávidas) podem suprimir tanto IFN- γ quanto a ativação de mediadores de TNF- α , o que implica em reduzida ativação da atividade fagocítica de macrófagos (Chaisavaneeyakorn et al., 2002). Outros hormônios tais como a progesterona favorece um padrão de produção de citocinas Th2; a relaxina produzida pelo corpo lúteo favorece ao perfil Th1 e o estradiol-17 β atua conforme sua concentração. Em altas concentrações o estradiol favorece a produção de IL-10 e, em baixas concentrações, a de IFN- γ (Entrican, 2002).

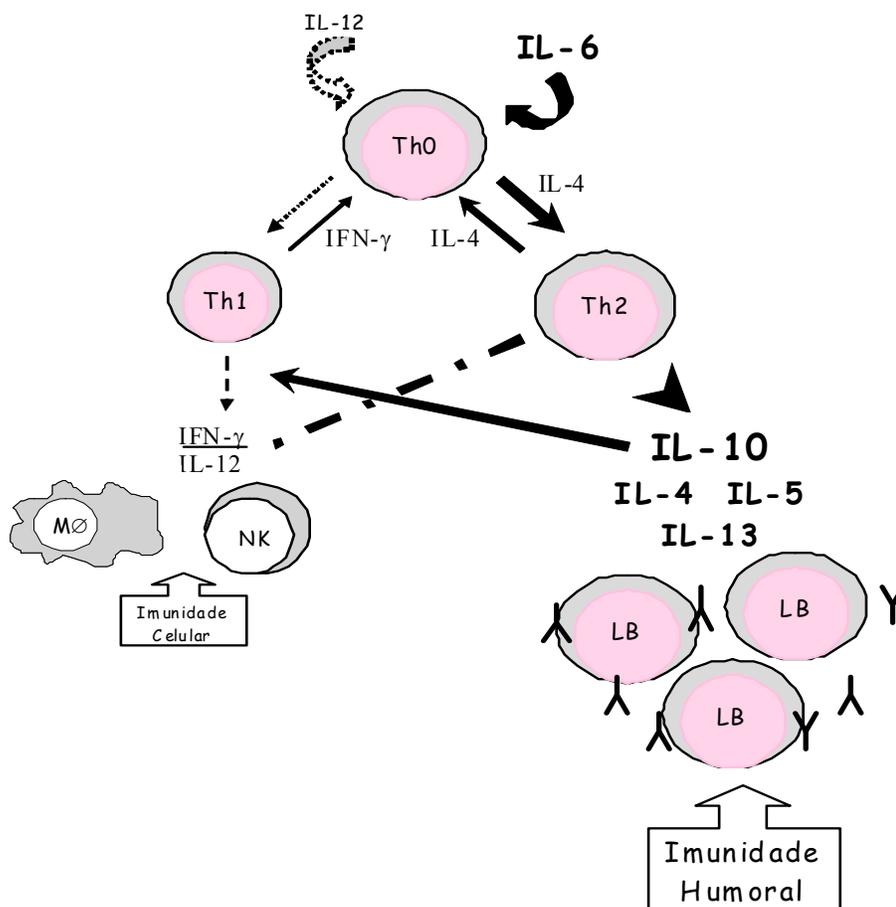


Figura 2. Prevalência de citocinas Th2 durante a gestação com conseqüente predomínio de uma imunidade humoral. IL4, IL5, IL13 e principalmente IL-10 apresentam-se no sangue, baço e ambiente uterino-placentário em concentrações maiores do que as citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2). IL-10 inibindo o crescimento de células Th1 mantém a resposta Th1 em níveis baixos. IFN- γ por sua vez não atinge os níveis necessários para impedir a ativação das células Th2 (modificado de Cutolo et al., 1998).

Recentemente, a presença de fatores imunossupressores em amostras de soro de mulher grávida foi demonstrada. Um destes fatores é representado pela Glicoproteína-1a, específica da gestação (PSG1a), a qual é sintetizada em grande quantidade pelo trofoblasto e é capaz de funcionar como um importante agente modulador de células T sistemicamente. A PSG1a induz uma ativação alternativa de monócitos e macrófagos, promovendo uma troca na diferenciação de linfócitos T para imunidade do tipo Th2, a qual é compatível com o sucesso da gravidez (Rahman et al., 2004). Outro fator com propriedade imunossupressora é a

Prostaglandina E2 (PEG2), um potente supressor da função de apresentação de antígenos por monócitos e da expressão de IL-2 pelas células T (Luppi, 2003).

A produção de citocinas não é o único mecanismo que pode explicar a aceitação materna de um feto semialogênico. Existem evidências para indução de tolerância das células T maternas para o feto alográfico, sendo este mecanismo mediado pela perda do triptofano nas células trofoblásticas, o qual é degradado pela indoleamina 2, 3 dioxigenase (IDO) (Munn et al, 1998). Embora a IDO tenha sido demonstrada primeiramente em camundongos, sua expressão também foi detectada em células trofoblásticas da placenta humana (Kudo et al, 2000). Entretanto, a intrincada rede de sinalização via citocinas ganha novas dimensões quando, associada à gestação, ocorre infecções patogênicas intracelulares como, por exemplo, a infecção por *Toxoplasma gondii*.

Como *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é considerada a mais relevante no mecanismo de regulação da infecção. Deste contexto, faz parte os linfócitos T, os macrófagos e as células Natural Killer (NK) (Sher et al., 1993; Gazzinelli et al., 1993).

Os macrófagos, quando ativados, produzem óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (ROI). Estas substâncias, atuando conjuntamente como o processo de apresentação aos linfócitos, têm ação tóxica contra o parasito. Macrófagos, na presença de *T. gondii*, produzem IL-12, que estimula as células NK e as células TCD4⁺ que, por sua vez, diferenciam-se na sub-população Th1, produtora de IL-2 e IFN- γ . Este efeito é muito importante na sobrevivência do hospedeiro. A produção de IFN- γ por células NK também é aumentada por IL-12, sendo também essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 (Kennedy et al., 1994). IL-2 é uma citocina que promove a proliferação e expansão clonal dos linfócitos no local da infecção, enquanto que IFN- γ é a mais potente citocina ativadora de macrófagos.

Como mencionado, a resposta imune ao parasito é principalmente fornecida pelas citocinas do perfil Th1. Em contrapartida, as citocinas dos linfócitos Th2, como IL-4 e IL-10, estão associadas ao aumento da

susceptibilidade à infecção, uma vez que a resposta imune ao parasito é preferencialmente celular.

Durante a gestação, a expressão aumentada de citocinas tipo Th2 pode causar maior susceptibilidade à toxoplasmose, conseqüentemente, à infecção placentária e fetal (Abou-Bacaret et al., 2004). No entanto, pode haver uma maior expressão de citocinas tipo Th1 devido à carga parasitária e virulência da cepa, o que pode ser prejudicial ao feto, muitas vezes acarretando aborto. Assim, a existências destas duas situações (gestação/infecção) impõem ao organismo materno adaptações que devem convergir para um padrão de resposta que leve em conta a existência de uma gestação saudável e a gravidade da infecção fetal (Abou-Bacaret et al., 2004).

O período da gestação que ocorre a infecção por *T. gondii* é importante para determinar o resultado da infecção. Se a infecção ocorre no primeiro trimestre quando os níveis de hormônio estão baixos, ocorre polarização para um perfil Th1. Portanto, a taxa de infecção é baixa e a chance de aborto é alta. De modo oposto, se a infecção ocorre no terceiro trimestre gestacional, quando há forte polarização Th2, é improvável a ocorrência de aborto. Entretanto, é alta a chance de transmissão congênita (Roberts, et al. 2001).

Em camundongos, a ativação de macrófagos por IFN- γ , em presença de co-estimuladores, como LPS ou TNF- α , é necessária para estimular a atividade citotóxica de macrófagos contra *T. gondii* (Sibley et al., 1993). O papel funcional de IFN- γ na interface materno-fetal é intrigante. Quando camundongos infectados por *T. gondii* recebem IFN- γ se observa uma proteção significativa exercida por esta citocina (McCabe et al., 1984; Suzuki et al. 1988); entretanto, quando se neutraliza IFN- γ em Balb/c em fase aguda da toxoplasmose, observa-se uma diminuição na infecção placentária e fetal de tais animais (Abou-Bacar et al., 2004). Entretanto, a linhagem de células trofoblásticas humanas (BeWo) são incapazes de controlar a infecção por *T. gondii*, mesmo quando tratadas com IFN γ (Oliveira et al., 2005; Barbosa et al., 2008).

1.3 A Placenta

A placenta é um órgão altamente especializado que fornece suporte ao crescimento e desenvolvimento normal do feto. Possui inúmeras funções: permite o transporte de oxigênio, água, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais e outros nutrientes para o feto; exerce atividade endócrina e protege o feto contra moléculas estranhas, infecções e doenças maternas. O processo de implantação e formação da placenta é um processo altamente coordenado envolvendo a interação entre células trofoblásticas e a mucosa uterina (Loke, King, Burrows, 1995).

Células trofoblásticas invadem os tecidos uterinos e remodelam as artérias espiraladas da parede uterina de modo a assegurar que o feto em desenvolvimento receba o suporte de sangue necessário para supri-lo das necessidades nutritivas, gasosas e de eliminação de excretas (Loke, King, Burrows, 1995).

A placenta humana é do tipo hemocorial que caracteriza pela presença de sangue materno em contato direto com as células trofoblásticas. Anatomicamente a placenta é subdividida em duas regiões, a placa coriônica, que compreende a parte fetal da placenta e a placa basal ou decídua basal, que é a parte materna. Entre estas duas regiões está o espaço interviloso, o qual contém a principal subunidade funcional da placenta - os vilos coriônicos e são extensamente banhados pelo sangue materno (Benirschke, Kaufmann, 2000).

Os vilos coriônicos são compostos pelo sincitiotrofoblasto (camada de trofoblasto sincicial localizada mais externamente), citotrofoblasto e tecido conjuntivo que contém os vasos sanguíneos fetais; estas estruturas em conjunto formam a barreira placentária (Gude et al., 2004).

A placenta humana é composta de vilos que flutuam no sangue materno - por isso denominados vilos flutuantes; e vilos em interação com a mucosa uterina (vilos de ancoragem) são responsáveis por ancorar a placa coriônica à placa basal ou decídua basal (Gude et al., 2004).

1.3.1 O trofoblasto

O trofoblasto é um tipo celular conhecido por sua capacidade intensa de proliferação e diferenciação. Exerce inúmeras atividades durante toda a gestação dentre elas: adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (Ferro, 2000).

O trofoblasto possui características únicas, responsáveis por regular o processo de penetração na parede uterina e placentação. O citotrofoblasto expressa moléculas de adesão e proteínases que possibilitam fixação e invasão. Além disso, fatores imunomoduladores importantes em permitir a tolerância materna ao feto que é semi alogêneo (Norwitz et al., 2001).

A invasão intersticial requer a regulação negativa de integrinas epiteliais e expressão de novas integrinas de migração (Zhou et al., 1997). As células trofoblásticas regulam positivamente a metaloproteinase 9 de matriz (MMP-9), capazes de degradar a membrana basal e a matriz extracelular do estroma uterino (Librach et al., 1991). Regulam também os inibidores teciduais de Metaloproteinase 3 (TIMP-3), capaz de regular a profundidade da invasão (Bass, et al., 1997).

O trofoblasto expressa também moléculas que funcionam na tolerância materna. Além disso, não expressam moléculas MHC classe II e classe Ia o que permite o não reconhecimento pelo sistema imunológico materno, mesmo estando em íntimo contato com o sangue materno (Entrican, 2002).

1.3.2 Explantes Placentários e Células de linhagem BeWo

Explantes de placenta humana são amplamente utilizados em estudos para a compreensão de mecanismos atuantes na interface materno-fetal, como transporte através da placenta, funções metabólicas e endócrinas (Miller et al., 2005).

Explantes de vilos placentários contêm inúmeros tipos celulares: células trofoblásticas, células do mesênquima fetal, células endoteliais, sanguíneas e células do sistema imunológico (células de Hoefbauer), portanto, mantêm o

mesmo grau de organização que a arquitetura celular do tecido *in vivo* (Miller et al., 2005).

Sob condições adequadas explantes placentários de primeiro e terceiro trimestre podem permanecer viáveis em condições de cultivo por até 12 dias (Miller et al., 2005). O acesso à viabilidade tecidual pode ser obtido por monitoramento da integridade morfológica - estudos de microscopia de luz e eletrônica (Miller, 2005); monitoramento da liberação hormonal - liberação de Gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônios esteróides marcam a capacidade secretória do trofoblasto (Huppertz et al., 2003); ou ainda por uso de testes de marcação de viabilidade, tais como MTT ou [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] para monitorar a função enzimática mitocondrial (Watson, Palmer, Burton, 1995).

Explantes podem ser utilizados em condições experimentais diversas tais como: apoptose, funções endócrinas, diferenciação, proliferação. Além disso, estudos de placentas de pacientes com patologias clínicas conhecidas podem ser utilizados para comparação com tecidos não patológicos (REF).

Explantes também têm sido aplicados em estudos de infecção *in vitro*. Tais estudos utilizam patógenos implicados na transmissão vertical de doenças, tais como *Trypanosoma cruzi* (Luján, et al., 2004), *Plasmodium falciparum* (Lucchi et al., 2008), *Toxoplasma gondii* (Ferro et al., 2008).

O interesse de aplicação de explantes como modelo de estudo é crescente. A aplicação deste modelos é reflexo da habilidade da placenta em se adaptar a diferentes condições de cultura. Os avanços nestes estudos permitirão melhor entendimento dos mistérios que ainda existem para o entendimento deste órgão tão complexo (Miller et al., 2005).

Outro importante modelo utilizado para estudo de trofoblasto e suas interações no ambiente materno são as células de linhagem BeWo. Estas células foram isoladas de coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey, e, desde então são mantidas em cultura.

Células BeWo retêm muitas das propriedades de células trofoblásticas normais tais como, secreção hormonal - gonadotrofina coriônica humana;

hormônio lactogênio placentário (Bahn et al., 1981); propriedade de adesão à células epiteliais do endométrio (Li et al., 2002). Além disso, secretam citocinas - IL4, IL6, IL8, IL-10 (Bennett et al., 1997) e fatores de crescimento. Apresentam ainda propriedades morfológicas e marcadores bioquímicos comuns ao trofoblasto humano (Van der Ende et al., 1990).

Tsui e colaboradores (2004) demonstraram que células BeWo secretam IL8 bem como expressam os receptores para IL8 e produzem progesterona de maneira semelhante ao encontrado em trofoblasto de gestação de primeiro trimestre. Observaram também que a quantidade de P4 secretada pelo trofoblasto de primeiro trimestre é mais alta que no terceiro trimestre. Como BeWo secreta altos níveis de P4 este autor sugeriu que estas células sejam modelos experimentais para se confrontar com células trofoblásticas de primeiro trimestre.

Com base no exposto fica claro que dois modelos de estudos (BeWo e explantes placentários) podem ser amplamente empregados para compreensão da interface materno-fetal. Células e tecidos “in vitro” mantêm muitas características dos tecidos “in vivo”. Atenção a estas características são importantes para caracterização da idade gestacional. Oscilações hormonais e de secreção de citocinas são observados em tecidos placentários e podem ter forte correlação com processos fisiológicos e patológicos que por sua vez modificam de acordo com a idade gestacional. A proposta deste estudo apoia-se na existência de modelos de estudo previamente caracterizados, aliada à necessidade de melhor compreensão da toxoplasmose na interface materno-fetal. Recentes estudos têm mostrado que MIF desempenha importante atividade na gestação sendo normalmente expressa em tecidos placentários. Outros estudos propõem que MIF tem importante atividade pro-inflamatória e antiparasitária. Tudo isso reforça a idéia que MIF pode ter importante propriedade de proteger contra infecção parasitária por *T. gondii* na interface materno-fetal.

2. JUSTIFICATIVA:

Considerando a necessidade de melhor compreender os processos envolvidos na transmissão vertical de *T. gondii*, aliada aos crescentes achados das funções de MIF associadas à gestação e às atividades microbidas contra inúmeros patógenos, propõe-se um modelo de estudo para simular a interface materno-fetal *in vitro* em uma situação de infecção por *T. gondii*.

O conhecimento da cinética de produção de MIF em explantes placentários e em células BeWo, sob condições de infecção por *T. gondii* pode contribuir para interpretar a habilidade de células infectadas por *T. gondii* em modular a secreção de MIF durante a gravidez. Assim, este é um importante modelo experimental para avaliar se MIF é capaz de promover proteção de células trofoblásticas contra infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVO:

O objetivo deste estudo foi investigar o possível papel de MIF na proteção de células trofoblásticas (células de coriocarcinoma humano - BeWo) como modelo experimental de primeiro trimestre de gestação e explantes de placenta de terceiro trimestre quando infectados por *T. gondii*

Objetivos específicos:

- Verificar produção e secreção de MIF em células BeWo infectadas com *T. gondii* ou estimuladas com STAg
- Verificar produção e secreção de MIF em explantes placentários de terceiro trimestre infectados com *T. gondii* ou estimulados com STAg
- Verificar a função de MIF em reduzir a susceptibilidade à infecção por *T. gondii*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de Placentas

Pacientes parturientes e sorologicamente saudáveis, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) foram informadas sobre os objetivos do trabalho. Após a autorização materna, comprovada pela assinatura do termo de consentimento (Anexo I) foram obtidas placenta a termo (36-40 semanas de gestação), provenientes de cesária para dissecação de vilos placentários. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo II).

4.2 *Toxoplasma gondii*

A cepa RH de *Toxoplasma gondii* foi mantida na cavidade peritoneal de camundongos Swiss por meio de repiques. Estes camundongos foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

O exsudato peritoneal dos camundongos foi colhido e centrifugado a 1,500 x g, temperatura ambiente por 5 minutos. Os taquizoítas resultantes foram ressuspensos e lavados duas vezes em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Sigma Chemical CO. St. Louis, USA). Estes parasitos foram então transferidos para garrafas de cultura contendo células BeWo, sendo mantidos nesta linhagem celular por repiques; ou armazenados a -70° C na presença de crioprotetor (dimetilsulfóxido - DMSO 10% + Soro Bovino Fetal - SBF) para posterior preparo de antígeno solúvel - STAg; ou ainda foram contados em câmara hemocitométrica para infecção de explantes de vilos coriônicos.

4.3 Produção de Antígeno Solúvel de taquizoítas (STAg)

Para preparar o antígeno solúvel a partir de taquizoítas, o exudato peritoneal de animais infectados foi lavado com PBS estéril e tratado com inibidores de protease (aprotinina 10µg/ml, leupeptina 50µg/ml e fenil-metil-sulfonil fluoreto - PMSF a 1.6 mM). Posteriormente, as suspensões contendo os taquizoítas foram lisados por seis ciclos de choque térmico e a seguir foram

sonicados. A suspensão de antígeno foi submetida à centrifugação (10,000 x g, 30 minutos a 4°C). O sobrenadante foi filtrado (membrana com poro de 0.22µm). A concentração de proteína foi determinada por método de Lowry (1951) e posteriormente estocados a -20°C.

4.4 Cultura de células, tratamento e infecção

Células de linhagem de coriocarcinoma humano (BeWo) foram obtidas do American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com antibióticos, L-glutamina, aminoácidos e Soro Bovino Fetal (10%).

Para obtenção de meio condicionado, células BeWo foram cultivadas em garrafas de cultura, infectadas com cepa RH de *T. gondii* e mantidas em estufa umidificada, a 37° C e 5% de CO₂. O sobrenadante (SPN) de cultura foi coletado após 24 horas e a concentração de MIF foi então determinada por teste ELISA. Este meio foi estocado a -80°C para uso posterior.

Posteriormente, células de linhagem BeWo foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas redondas de 13mm (4 x 10⁵ células/poço). As células foram cultivadas em meio RPMI (300µl/poço), ou em meio de cultura contendo rMIF (R&D Systems) - 50ng/ml, ou meio de cultura adicionado de anticorpo policlonal de cabra anti MIF humano (10µg/ml) (R&D Systems) ou ainda meio condicionado (SPN com concentração de MIF a 3ng/ml), ou SPN (3ng/ml de MIF) com adição de anticorpo policlonal de cabra anti MIF humano (10µg/ml), ou STAg (20µg/ml). As células estimuladas foram então incubadas por 24 horas em estufa de CO₂, 37°C.

Em seguida, células BeWo foram infectadas ou não com a cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos/célula) e incubadas por 3 horas. Posteriormente, as células foram lavadas e novamente estimuladas ou não com rMIF, SPN, SPN adicionado de anti-MIF ou STAg e novamente incubadas em estufa umidificada, a 37° C e 5% de CO₂.

Após 24 e 48 horas de incubação, sobrenadantes de células foram coletados e armazenados a -80°C para posterior mensuração de MIF por teste ELISA ou

para dosagem de Óxido Nítrico (NO) pelo método de Griess (Green et al., 1982). Células foram fixadas em formalina (10%) em TBS para ensaio de Imuno-histoquímica ou coradas com hematoxilina/eosina para determinar a replicação intracelular de parasitos (média do número de parasitos por células infectadas), ou para determinar o índice de infecção (porcentagem de células infectadas pelo total de células examinadas - cem células por lamínula).

4.5 Cultura de explantes de vilos coriônicos humanos, tratamento e infecção

Os tecidos placentários foram depositados em PBS gelado estéril e processados dentro de até uma hora após a coleta. O tecido foi então lavado em PBS e dissecado assepticamente sob estereomicroscópio para remover tecidos endometriais e membranas fetais. Vilos flutuantes com cinco a sete extremidades livres foram selecionados, como descrito por Caniggia e colaboradores (1977). Explantes (0.5-1.0 mg) foram transferidos para placas de cultura de 96 poços e cultivados em meio RPMI (260 µl/cavidade), suplementados com 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, L-glutamina (1%), aminoácidos não essenciais (1%), piruvato de sódio (1%), em ausência de Soro Fetal Bovino. Os vilos foram incubados a 37°C em estufa de CO₂.

Antes da infecção os vilos foram incubados em meio de cultura ou em meio de cultura contendo STAg durante 24 horas. Posteriormente os explantes foram infectados ou não com a cepa RH de *T. gondii* em duas concentrações distintas de taquizóitas (5x10⁶ e 1x10⁷ parasitos/poço). Após 12 horas de infecção, os vilos foram lavados e novamente estimulados ou não com STAg e mantidos em estufa de CO₂ por 24, 48 e 72 horas. Os vilos foram coletados para análise morfológica e Imuno-histoquímica e os sobrenadantes foram armazenados a -80°C para dosagem de MIF por ELISA e para dosagem de NO pelo método de Griess (Green et al., 1982).

4.6 Análise histológica

Para estudo dos vilos à microscopia de luz os explantes foram fixados em formalina 10% em tampão PBS. Os tecidos foram desidratados em álcoois e concentrações crescentes e embebidos em glicol metacrilato (Historesin, LKB, Bromma, Sweden). Cortes de 2 μ m foram corados em azul de toluidina (1%) analisados em microscópio de luz.

Para estudo de microscopia eletrônica de transmissão os explantes foram fixados em glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 2% em 0.2M de PBS. Os tecidos foram desidratados em acetona (concentrações crescentes). Para infiltração, os cortes foram inicialmente submetidos a uma mistura de acetona e resina Epon e por último, foram incluídos em resina pura e permaneceram em estufa a 60° C para polimerização.

Cortes semi-finos e ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Reichert-Jung. Telas de cobre, contendo os cortes ultrafinos, foram contrastadas pelo acetato de uranila 2% em água destilada durante 40 minutos a 37°C (Watson, 1958) e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada (Reynolds, 1963), durante 30 minutos. A seguir, o material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico Zeiss - EM 109 do Centro de Microscopia Eletrônica do Setor de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

4.7 Imuno-histoquímica

Os explantes placentários foram fixados em formalina 10% em TBS, desidratados (em álcoois de concentrações crescentes) e incluídos em parafina. Cortes de 4 μ m foram submetidos ao resgate antigênico em solução de tripsina 0.5% e cloreto de cálcio (1%) em água destilada por 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, cortes histológicos dos vilos coriônicos e células BeWo presentes em lamínulas redondas foram incubadas em ácido acético 5% a temperatura ambiente (para bloqueio da fosfatase alcalina endógena) e lavadas com tampão TBS. Posteriormente, foram tratados com soro normal de cabra 2.5% para bloqueio de sítios inespecíficos. A seguir os tecidos placentários e as células BeWo foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti MIF humano (R&D Systems), (1:200) overnight a 4°C. O material foi então lavado com

TBS e incubado com anticorpo biotilado de cabra anti IgG de camundongo a 37°C (Santa Cruz, Biotechnology). As amplificações foram feitas com o Kit ABC (Vectastain Laboratories, Inc., Burlington, Canada). A reação foi desenvolvida com fast red-naftol (Sigma Chemical Co) e contracorado com hematoxilina de Meyer. As lâminas e lamínulas foram montadas com glicerina, analisadas e fotografadas em microscópio de luz com câmara fotográfica acoplada.

4.8 Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Sobrenadantes de cultura de explantes placentários de células BeWo (controles e tratados) foram usados para determinar a concentração de MIF por ensaio ELISA sanduíche. Primeiramente, placas para ELISA com 96 cavidades foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-MIF humano (R&D Systems), “overnight” a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBS Tween 20 e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (Soro Albumina Bovina - BSA 1% e sacarose 5% em PBS) e incubados a temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos. Após lavagem das placas, 100µl das amostras foram adicionadas em duplicata e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas e incubadas com anticorpo de cabra anti-MIF humano biotilado (R&D Systems). Após novas lavagens, as placas foram incubadas com estreptavidina acoplada a peroxidase (Sigma) por 20 minutos a temperatura ambiente. A seguir adicionou-se 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina (TMB) (Polyscience, Inc, Warrington, PA). Os imunocomplexos foram quantificados em um leitor de microplacas (Titertek®multiskan plus). A concentração de MIF foi então determinada com base em uma curva padrão obtida de concentrações conhecidas de MIF recombinante - R&D Systems, (25 - 2000 µg/ml).

4.9 Dosagem de NO

A concentração de nitrito em sobrenadantes de células BeWo e em explantes de placentas foi mensurado pelo método de Griess (Green et al., 1982). Brevemente, amostras foram adicionadas em placas de 96 poços. A seguir

adicionou-se sulfanilamida 1% e diidrocloreto de naftaleno - NEED 0.1% (na proporção 1:1) em H₃PO₄ 2.5% . A absorbância (A₅₇₀) foi determinada em leitor para microplacas (Titertek®multiskan plus) com referência a uma curva padrão de nitrito de sódio - NaNO₂ (5-100µmol/L).

4.10 Concentração protéica

Explantos de vilos congelados foram homogeneizados e macerados em tampão RIPA [50mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 1% (v/v) triton x-100, 1%(w/v) deoxicolato de sódio e 0.1% (w/v) SDS, pH 7.5] adicionado de coquetéis de inibidor de protease (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). O homogenado foi centrifugado a 15000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado para mensuração da concentração protéica pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A concentração total de proteína foi usada para normalizar os resultados de ELISA obtidos de explantes de tamanhos diferentes. A quantificação de MIF (pg/ml) foi feita com base na quantidade total de proteína (mg/ml) e, portanto, os resultados foram expressos em pg/mg.

4.11 Análise estatística

Dados da dosagem de MIF e de índices de parasitismo foram expressos pela média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre as médias foram analisadas usando teste t de Student por meio do programa Graph Pad Prism. Diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Produção de MIF em células trofoblásticas de linhagem BeWo

Para verificar se células BeWo infectadas com *T. gondii* ou tratadas com STAg ou ainda tratadas com STAg e infectadas com *T. gondii* são capazes de induzir maior liberação de MIF em relação ao controle (não infectadas e não estimuladas), determinou-se a produção de MIF em sobrenadantes de cultura. Os resultados mostraram que após 24 horas de cultura a produção de MIF foi aumentada em células BeWo estimuladas com STAg se comparadas com o controle. Uma produção de MIF ainda maior foi observada quando as células foram infectadas com *T. gondii* ou células estimuladas com STAg e infectadas com *T. gondii* (Figura 1A).

Após 48 horas de infecção observou-se acentuado aumento na produção de MIF. Embora tenha ocorrido um aumento na produção de MIF em células estimuladas com STAg esta diferença não foi estatisticamente significativa. Diferenças estatísticas só foram observadas quando as células BeWo foram somente infectadas ou em células tratadas com STAg e posteriormente infectadas com *T. gondii* (Figura 1B).

Resultados de Imuno-histoquímica coincidem os dados de ELISA. Imunomarcagem para MIF no controle (Figura 2A) foi menos intensa que a marcação encontrada em células estimuladas por STAg (Figura 2B). Uma marcação mais intensa foi observada em células infectadas por *T. gondii* (Figura 2C) bem como em células tratadas com STAg e infectadas (Figura 2D).

5.2 Efeito de MIF no controle da replicação intracelular de *T. gondii*

Após observação de que a produção de MIF é aumentada quando células são estimuladas com STAg e com *T. gondii*, nós investigamos a função desta citocina no controle da replicação intracelular do parasito. Para verificar a função de MIF endógeno bloqueou-se esta citocina com anticorpo policlonal anti-MIF humano. Verificou-se por meio de teste ELISA que a concentração de anticorpo utilizada foi capaz de bloquear 89.09% do MIF secretado pelas células BeWo (dado não mostrado). Além disso, para verificar a função da citocina exógena estimulou-se

as células BeWo com rMIF ou com MIF previamente produzida em meio condicionado (SPN) ou ainda SPN com neutralização de MIF via incubação com anticorpo anti-MIF por 1 hora a 37° C.

Os resultados mostraram a importância de MIF no controle da replicação intracelular de *T. gondii*. Células que tiveram MIF endógeno bloqueado por ação de anticorpo mostraram um aumento no número de parasitos intracelulares, indicando um maior índice de replicação de parasitos. Quando as células BeWo foram estimuladas com rMIF houve redução do número de parasitos, portanto, menor índice de replicação. Uma redução ainda mais significativa do número de parasitos foi observada quando as células foram estimuladas com SPN. Para verificar se esta redução relacionava-se à presença de MIF no meio condicionado, bloqueou-se MIF contido neste meio. Verificou-se que houve um aumento no número de parasitos intracelulares quando comparado com o experimento contendo apenas SPN; entretanto, este número foi ainda menor que o obtido no controle. Estímulo prévio com STAg e posterior infecção mostrou número de parasitos por célula semelhante ao observado no controle (Figura 3A e 3B)

5.3 Efeito de MIF no controle do índice de infecção por *T. gondii*

Nesta abordagem experimental observou-se que o bloqueio de MIF endógeno com anticorpo anti-MIF resulta em aumento no índice de invasão. De modo oposto, quando as células foram estimuladas com rMIF ocorreu uma redução no índice de infecção. Uma redução ainda mais significativa foi observada quando as células foram estimuladas com SPN. Células incubadas com SPN previamente incubadas com anti-MIF apresentaram um maior índice de infecção quando comparadas com células incubadas somente com SPN. Este número foi menor que o observado no controle. Células estimuladas com STAg apresentaram uma redução no índice de infecção quando comparadas com o controle, entretanto, estes valores não foram estatisticamente significativos.

5.4 Análise Morfológica de explantes placentários

Para acessar a integridade estrutural e ultra-estrutural dos explantes e para verificar a infectividade de *T. gondii* em vilos coriônicos foi realizado o estudo de microscopia de luz e eletrônica nestes tecidos. Segundo Miller et (2005) o monitoramento da morfologia é um dos mais importantes testes para acessar a viabilidade *in vitro*.

Por meio da microscopia de luz foi possível verificar a integridade dos vilos coriônicos. Os componentes estruturais observados foram: sinciciotrofoblasto, com células sinciciais envolvendo os vilos coriônicos e internamente, em íntimo contato com esta camada celular observou-se o citotrofoblasto. No tecido conjuntivo das vilosidades observou-se vasos sanguíneos fetais, além de inúmeras células mesênquimais, células endoteliais e as células da imunidade da placenta, particularmente, as células de Hofbauer (Figura 4A).

A integridade estrutural foi confirmada pela microscopia eletrônica. Por meio desta foi possível observar que não houve desprendimento do trofoblasto, este mostrou estrutura íntegra. Além disso, não foram observadas estruturas em necrose. Sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto apoiados em uma espessa membrana basal puderam ser observados (Figura 4B).

O estudo da morfologia (estrutural e ultra-estrutural) também permitiu observar *T. gondii* nos vilos placentários. Em todos os horários estudados foi possível detectar presença de parasitos intracelulares (Figura 5A e 5B).

5.5 A produção de MIF em explantes placentários de terceiro trimestre não é aumentada devido à infecção por *T. gondii*

Para verificar se *T. gondii* ou o antígeno solúvel deste parasito é capaz de promover aumento da produção de MIF quando comparado com o controle realizou-se esta abordagem experimental. MIF foi mensurado em sobrenadantes de cultura após 24, 48 e 72 horas de infecção. Os dados obtidos foram normalizados com base quantidade total de proteína dos explantes placentários de vilos coriônicos.

Os resultados mostram que a produção de MIF não foi diferente em nenhuma das condições experimentais (controle, estímulo com STAg, infecção com *T. gondii*). A produção de MIF só aumentou com o tempo de cultura. Entre condições experimentais idênticas foi possível observar aumento da produção de MIF com o aumento do tempo em que foram mantidos em cultura (Figura 6). Resultados de Imuno-histoquímica apresentaram, características semelhantes (Figura 7A e 7B).

5.6 Produção de Óxido Nítrico (NO)

Para saber se as células BeWo respondem à infecção por *T. gondii* e aos estímulos por meio da produção de Óxido Nítrico, sobrenadantes de cultura de células BeWo e de explantes placentários foram utilizados para mensuração de NO. Nenhuma produção de NO foi detectada nas condições experimentais com BeWo ou com explantes (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

Embora a toxoplasmose seja uma doença geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, esta pode ser grave quando associada à gestação, sendo uma importante causa de infecção pré-natal (Pinon et al., 1996). As conseqüências da doença são variáveis podendo provocar abortos, patologias em recém-nascidos ou ainda manifestar-se tardiamente, podendo resultar em seqüelas no indivíduo adulto (Ambroise-Thomas, Pelloux, 1993).

Acredita-se que o trofoblasto seja um componente importante para impedir a transmissão vertical de parasitos uma vez que este tipo celular é a principal barreira entre a circulação materna e a circulação fetal (Pfaff, et al., 2005). Entretanto, muitas vezes esta barreira pode ser vencida por alguns microorganismos, tais como por *T.gondii*, resultando em potencial infecção fetal. Embora já se conheçam alguns mecanismos associados a esta transmissão, muitos outros permanecem não resolvidos.

Neste estudo propomos dois modelos para analisar a resposta do trofoblasto frente ao estímulo desencadeado por *T. gondii*. Explantes obtidos de placentas a termo foram utilizados como modelo de trofoblasto do terceiro trimestre. Células de linhagem de coriocarcinoma humano, BeWo, foram utilizadas para representar o trofoblasto de primeiro trimestre de gestação.

Não existe na literatura uma caracterização definitiva de células BeWo em relação a idade gestacional. Entretanto, há estudos propondo que células BeWo sejam um bom modelo para estudo de trofoblasto do primeiro trimestre devido a presença de alguns fatores que caracterizam esta fase. Os níveis de RNA mensageiro para receptor de interleucina 8 (IL-8R) e a expressão protéica desta interleucina em células BeWo são similares aos encontrados em células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação. Além disso, a secreção de progesterona (P4) em células BeWo é comparável ao que se obtém em células trofoblásticas de primeiro trimestre e mais alto que os níveis obtidos em trofoblasto de terceiro trimestre (Tsui, et al., 2004).

Os resultados aqui apresentados mostraram que a secreção de MIF foi aumentada em células BeWo infectadas com *T. gondii* ou estimuladas com STAg

quando comparadas com células controle – não infectadas . Entretanto, a infecção ou o estímulo com STAg em explantes placentários produziram uma secreção de MIF em quantidades semelhantes aos valores encontrados no controle. Considerando estes resultados, com base em nosso modelo adotado para idade gestacional, temos que o trofoblasto de primeiro trimestre é capaz de aumentar a produção de MIF frente à infecção. Entretanto, isso não ocorre para o trofoblasto de terceiro trimestre. Desta forma, nós sugerimos que a secreção de MIF esteja relacionada com algum mecanismo de proteção de células trofoblásticas contra infecção por *T. gondii*.

Além disso, o número de parasitos por célula e o índice de infecção analisados mostraram que MIF exógeno foi capaz de reduzir a replicação de *T. gondii* intracelular, e, promoveram uma redução na porcentagem de células infectadas. Um resultado oposto foi observado com o bloqueio de MIF endógeno, no qual ocorreu maior susceptibilidade de BeWo à infecção.

A atividade protetora de MIF já foi proposta para inúmeros outros modelos de infecção. MIF tem atividade pro-inflamatória atuando em microorganismos mais simples como bactérias (Bozza, et al., 1999; Koebernick et al., 2002) até os mais complexos tais como protozoários (Reyes et al., 2006; Jüttner et al, 1998) e helmintos (Rodriguez-Sosa et al., 2003).

Este é o primeiro trabalho que associa a produção de MIF com a proteção de células ou tecidos placentários contra infecção por *T. gondii*. Os mecanismos responsáveis por mediar esta proteção ainda precisam ser esclarecidos. É provável que tais mecanismos sejam similares aos observados na proteção contra outros patógenos. Dessa forma propõe-se que na presença de MIF exógeno, ocorra um sinergismo com outras citocinas pro-inflamatórias cujo efeito desencadeia em uma resposta protetora contra infecção.

Provavelmente, o bloqueio de MIF endógeno levou a um aumento dos índices de infecção e de replicação de *T. gondii* em virtude da atividade antiinflamatória, favorecida pela ausência de MIF intracelular. É possível que com o bloqueio de MIF tenha desencadeado em uma atividade imunossupressora em virtude da não regulação da atividade hormonal, desta forma propiciando

um microambiente favorável ao parasito. Glicocorticoides exercem atividade anti-inflamatória por induzir a síntese do inibidor de fosfolipase citoplasmática A2 (cPLA2), desta forma evitando a liberação de mediadores pro-inflamatórios e moléculas de adesão (Aljada et al., 2001; Cronstein et al., 1992). MIF atua inibindo esta via permitindo transcrição gênica de mediadores inflamatórios (Calandra, Roger, 2003).

Em infecção por *Salmonella typhimurium* (Koebernick e al., 2002) MIF sinergiza com TNF α e IL1 amplificando a resposta inflamatória. Entretanto, camundongos MIF^{-/-} apresentaram baixa produção de TNF α e, portanto, a proteção contra *S. typhimurium* é prejudicada (Koebernick e al., 2002).

Em modelo de infecção para *Trypanosoma cruzi* observou-se aumento da suscetibilidade de camundongos MIF^{-/-} à infecção por *T. cruzi*. Este aumento de suscetibilidade ocorreu devido aos níveis reduzidos de citocinas pro-inflamatórias tais como TNF α , IL12, IL18, IFN γ nestes camundongos. Com isso, mostrou-se o papel de MIF em controlar a fase aguda da infecção por estes parasitos (Reys et al., 2006). Mecanismos semelhantes são descritos para outros parasitos tais como *L. major*. Em todos estes modelos de infecção foi demonstrado um forte efeito de MIF em estimular citocinas pro-inflamatórias (Jüttner et al., 1998).

A compreensão dos mecanismos de ação de MIF, ainda pouco esclarecidos, pode ajudar na compreensão de como esta citocina atua no processo de infecção produzindo os resultados obtidos contra infecção por *T. gondii*.

Dentre as inúmeras funções descritas para MIF, esta citocina tem a capacidade de mediar um perfil inflamatório devido a estímulo, mesmo na presença de hormônios imunossupressores (Mitchell et al., 1999). Vale lembrar que além da atividade imunossupressora de hormônios, os próprios parasitos conseguem manipular algumas vias de sinalização de modo a prevenir uma resposta pro-inflamatória do hospedeiro. Estudos mostram que *T. gondii* interage com as vias de sinalização de macrófagos para tentar evadir da resposta imunológica (Masek et al., 2006). Por exemplo, parasitos bloqueiam fatores de transcrição associados com a defesa tais como NF-kB (Butcher et al., 2001) e

STAT1 α (Luder et al., 2001), enquanto promove a ativação de STAT 3 que suprime a síntese de IL-2 (Butcher et al., 2005).

Assim, é provável que MIF atue em células trofoblásticas restabelecendo uma condição pro-inflamatória, favorável a atividade antiparasitária. Sabe-se que MIF endógeno e exógeno atua na via de sinalização intracelular induzindo a ativação de quinases. A via de ativação MAPK induzida por MIF resulta na fosforilação e ativação de cPLA2 que culmina com transcrição e tradução de citocinas pro-inflamatórias e moléculas de adesão (Mitchell et al., 1999).

A fosforilação das MAPKs, em especial, p38 e ERK1/2 mostram-se importantes reguladores da produção de IL-12 por macrófagos (Kim et al., 2005; Mason et al., 2004). Portanto, fazem parte das atividades antiparasitárias do hospedeiro.

Provavelmente MIF atue como um mediador inflamatório responsável pela atividade antiparasitária protetora observada neste experimento. Embora, novos estudos sejam necessários para comprovação dos mecanismos que operam neste sistema e para verificar quais citocinas estão atuando em sinergismo com MIF. Estudos anteriores mostraram que um aumento da transmissão transplacentária da toxoplasmose ocorre com o aumento da idade gestacional. A probabilidade de infecção fetal é de apenas 1% quando a infecção materna primária ocorre em período pré-concepção. A infecção adquirida durante o primeiro trimestre da gestação por mulheres não tratadas com drogas anti-*T. gondii* resultam em infecção em 10-25% dos casos (Lynfield, Guerina; 1997). Já as infecções que ocorrem no segundo e terceiro trimestre têm maior incidência de infecção fetal atingindo valores entre 30-54 e 60-65%, respectivamente (Lynfield, Guerina; 1997). Esses dados são consistentes com nossa hipótese que sugere que MIF possa ser uma importante citocina na defesa contra *T. gondii*. O aumento da secreção de MIF em células BeWo frente a infecção pode estar relacionado com a menor suscetibilidade de trofoblasto de primeiro trimestre à infecção. De modo semelhante uma maior suscetibilidade de trofoblasto de terceiro trimestre pode estar associada à incapacidade deste trofoblasto de regular positivamente a produção de MIF frente à infecção.

É importante ressaltar que embora este estudo tenha utilizado modelos experimentais distintos (linhagem celular BeWo e explantes de placenta a termo), esta correlação é embasada em outros estudos de nosso grupo de pesquisa. Um trabalho recente realizado em explantes placentários de primeiro trimestre mostraram que estes tecidos foram capazes de estimular aumento de secreção de MIF frente ao estímulo por STAg (Ferro et al., 2008). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos em nossos experimentos com BeWo e reforçam a nossa idéia de que a regulação desta citocina frente a estímulos por *T. gondii* é diferente em trofoblasto de primeiro e terceiro trimestre. Diante disso, é possível descartar qualquer hipótese de que a não regulação de MIF foi devido à inviabilidade tecidual ou devido à comparação entre células e tecidos.

Alguns estudos têm proposto que a diferença de infectividade de *T.gondii* em diferentes idades gestacionais se justifique em função da barreira placentária, que funciona independente de uma resposta imunológica materna induzida por *T. gondii* (Pffaf et al., 2007). Em fases iniciais da gestação, nas quais existe uma barreira mais espessa, têm-se um menor índice de transmissão e estes índices aumentam com o aumento da idade gestacional quando a barreira torna-se mais estreita. É provável que a diminuição da barreira placentária possa estar associada com o índice de infecção (Fricker-Hidalgo et al., 1998; Ajzenberg et al., 2002). Entretanto, nós não acreditamos que isso ocorra apenas devido à diminuição da barreira física, dado que *T. gondii* é um parasito ativo capaz de atravessar inúmeras barreiras biológicas - disseminando dentro de diferentes órgãos inclusive o cérebro (Barragan, Sibley, 2002). Eventualmente, a diminuição da espessura da barreira placentária durante a fase final da gestação pode estar relacionada com a redução da secreção de MIF, uma vez que o citotrofoblasto fica bastante reduzido nesta fase da gestação. Esta condição pode desencadear em menor proteção dos vilos, uma vez que o citotrofoblasto é a principal fonte de secreção de MIF em tecidos placentários de primeiro trimestre (Ferro et al., 2008). A presença desta camada, embora reduzida, em fase final da gestação foi confirmada neste experimento, entretanto, com pouca expressão de MIF.

Inúmeros estudos têm mostrado que os mecanismos que operam como agentes anti-parasitários contra *T.gondii* em trofoblasto, são distintos aos que ocorrem para outros tipos celulares. Uma evidência disto é que células trofoblásticas apresentam maior susceptibilidade à *T. gondii* quando comparado a outros tipos celulares (Oliveira et al., 2005; Barbosa et al.; 2008). Além disso, inúmeros mecanismos que operam em células não trofoblásticas mostraram-se inoperantes em trofoblasto. Por exemplo, IFN γ é uma citocina crucial na regulação da multiplicação de *T. gondii* em diferentes tipos de células (Suzuki et al., 1988). Entretanto, células de linhagem trofoblástica BeWo são menos susceptíveis a *T. gondii* quando estimuladas com IFN γ (Pfaff et al., 2005). Além disso, a produção de Óxido Nítrico (NO) é um importante agente limitador do crescimento de *T. gondii* em muitos tipos celulares. Entretanto, sobrenadantes de células BeWo e de explantes placentários infectados com *T. gondii* ou estimulados com STAg não produziram NO, mesmo após estimulação com MIF (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram descritos por outros autores. Oliveira e colaboradores (2005) e Pffaf e colaboradores (2005) mostraram que células BeWo infectadas com *T. gondii* não produzem NO. Além disso, NO também não é secretado por explantes placentários de primeiro trimestre (Ferro et al., 2008).

Células trofoblásticas apresentam características que as distinguem de outros tipos de células. Ausência de receptores clássicos de MHC I (Complexo de Histocompatibilidades Principal tipo I) tais como aqueles codificados por Antígeno Leucocitário Humano A e B (HLA-A e HLA-B). Com isso estas células são protegidas contra o reconhecimento por linfócitos T, protegendo-as contra lise por células NK - Natural Killer (Loke e King, 1997). Além disso, estas células secretam uma série de fatores anti-inflamatórios tais como TGF- β (Fator de Crescimento Tumoral), IL-10 e hormônios da gestação (Ando et al., 1998, Entrican, 2002).

Dentre os hormônios secretados pela placenta durante a gestação a progesterona e os hormônios glicocorticoides têm influência direta e indireta em promover o balanço da resposta imunológica, de modo a evitar rejeição ao feto semi-alográfico (Krishnan et al., 1996; Miyaura, Iwata 2002). Portanto, a

progesterona atua mantendo o perfil de resposta imunológica do tipo Th2 em detrimento de células de perfil Th1. Evidências disso são as alterações do curso de algumas doenças ligadas ao perfil inflamatório durante a gestação. Progesterona melhora os sintomas da artrite reumatóide, uma doença de perfil pro-inflamatório, enquanto o lúpus eritematoso sistêmico, uma doença ligada ao perfil Th2 tende a piorar durante a gestação (Wilder, 1998; Ostensen, 1999).

Além disso, a progesterona e glicocorticoides estão ligados com prejuízo da resistência de camundongos a doenças infecciosas, tais como leishmaniose (Krishnan, et al., 1996), toxoplasmose (Luft, Remington, 1982) e malária (Menendez, 1995). Isso ocorre devido à regulação negativa de linfócitos aos antígenos específicos para estas infecções. Portanto, quando a infecção por *T. gondii* ocorre no primeiro trimestre, quando os níveis de hormônio estão baixos, ocorre polarização para um perfil Th1, assim, a taxa de infecção é baixa e a chance de aborto é alta. De modo oposto, se a infecção ocorre no terceiro trimestre gestacional, quando há forte polarização Th2, é improvável a ocorrência de aborto. Entretanto, é alta a chance de transmissão congênita (Roberts, et al. 2001).

MIF é a única citocina descrita até o momento capaz de vencer o efeito imunossupressivo de hormônios glicocorticoides e promover um perfil de resposta pro-inflamatória (Flaster et al., 2007).

Isso reforça nossa ideia de que MIF esteja atuando em mediar proteção de células trofoblásticas contra infecção a patógenos, tais como *T. gondii*, em trofoblasto de primeiro trimestre. Provavelmente, a ausência desta regulação no terceiro trimestre ocorra devido à redução natural da secreção desta citocina nesta fase devido à diminuição da camada de citotrofoblasto. Além disso, as diferenças hormonais no primeiro e terceiro trimestre podem ser responsáveis pela diferença de regulação de MIF.

O completo entendimento dos mecanismos de ação de MIF será um importante passo na compreensão das particularidades da resposta do trofoblasto à infecção, propiciando o entendimento dos mecanismos envolvendo a transmissão vertical da toxoplasmose na gestação.

7. CONCLUSÕES

- Células BeWo de primeiro trimestre estimuladas com STAg e infectadas com *T.gondii* secretam maior quantidade de MIF que células controle (não infectadas e não tratadas);
- Explantes placentários de terceiro trimestre não são capazes de aumentar a secreção de MIF em função de estímulo (STAg ou infecção com *T. gondii*);
- Bloqueio de MIF endógeno leva a uma maior susceptibilidade de células BeWo à infecção por *T. gondii*;
- Estímulo de células BeWo com MIF exógeno protege estas células contra infecção por *T. gondii*

Assim, todos os nossos resultados mostraram que MIF pode estar envolvido na resistência de células trofoblásticas de linhagem BeWo contra infecção *T. gondii*. A ausência de regulação positiva de MIF em explantes de vilos coriônicos pode ter relação com a idade gestacional e com a redução da camada de citotrofoblasto que é produtora de MIF. Esta ausência de regulação pode ser a principal responsável pela maior suscetibilidade de infecção por *T. gondii* no terceiro trimestre de gestação.

8. ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar da pesquisa chamada **Possível papel do MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) na proteção de células trofoblásticas submetidas à infecção por *Toxoplasma gondii*: modelo em explantes de placentas de 3º trimestre**, sob responsabilidade dos pesquisadores: Dra Eloisa Amália Vieira Ferro, Dr José Roberto Mineo, Angelica de Oliveira Gomes e a médica obstetra Dra Maria Célia dos Santos. Nesta pesquisa estamos buscando entender como ocorre a eliminação do parasito *Toxoplasma gondii* durante a gravidez.

Na sua participação você fornecerá a placenta resultante do parto, sabendo que a coleta deste material não trará prejuízos para sua saúde ou para a saúde de seu filho, uma vez que este material será normalmente expulso pelo seu organismo após o parto, e, então será coletada pela médica Dra Maria Célia e será entregue a Angelica para conduzir a pesquisa. Caso a placenta não fosse utilizada para esta pesquisa seria descartado após o parto. Além disso, você permitirá que os pesquisadores tenham livre acesso à sua ficha médica para sabermos se você possui toxoplasmose. A pesquisa trará futuros benefícios para mães e filhos com toxoplasmose.

Em nenhum momento você será identificada. Os resultados da pesquisa serão publicados e, ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar na pesquisa.

A senhora é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para senhora ou para seu filho.

Uma cópia deste Termo livre e Esclarecido ficará com a senhora. Qualquer dúvida a

respeito da pesquisa a senhora poderá entrar em contato com os pesquisadores ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia:

Angelica de Oliveira Gomes
Laboratório de Histologia – ICBIM
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama – Bloco 2B
Telefone/Fax: 3218-2240

Eloisa Amália Vieira Ferro
Laboratório Histologia – ICBIM
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama – Bloco 2B
Telefone/Fax: 3218-2240

José Roberto Mineo
Laboratório de Imunoparasitologia
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama - Bloco 4C
Telefone: 3218-2195/ Fax: 3218-2333

Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Santa Mônica – Bloco “J”
Telefone: 3239-4531

Uberlândia, ____ de _____ de 2007

Assinatura da participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Assinatura de testemunha

9. ANEXO II: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP-UFU)



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531

ANÁLISE FINAL Nº 103/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 025/07

Projeto Pesquisa: "Possível papel do MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) na proteção de células trofoblásticas submetidas à infecção por *Toxoplasma gondii*: modelo em explantes de placentas de 3º trimestre"

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

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

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

O CEP/UFU lembra que:

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

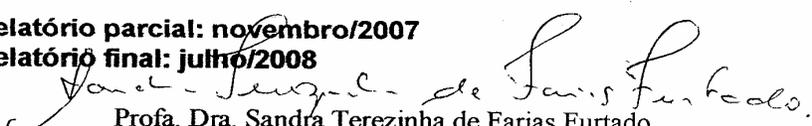
b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

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

Data para entrega do Relatório parcial: novembro/2007

Data para entrega do Relatório final: julho/2008

09 de abril de 2007.


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

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

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

10. FIGURAS

Figura 1A

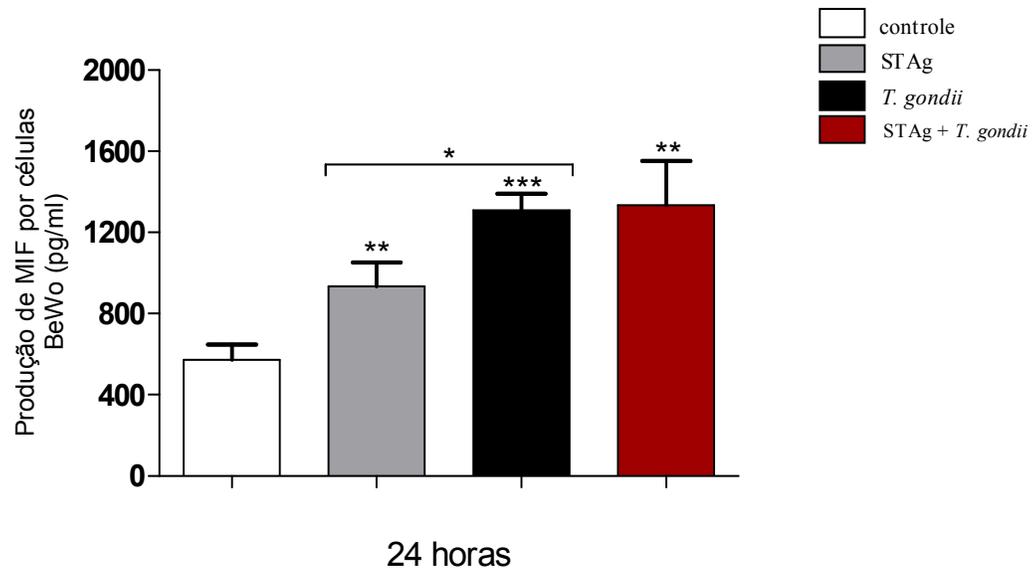


Figura 1B

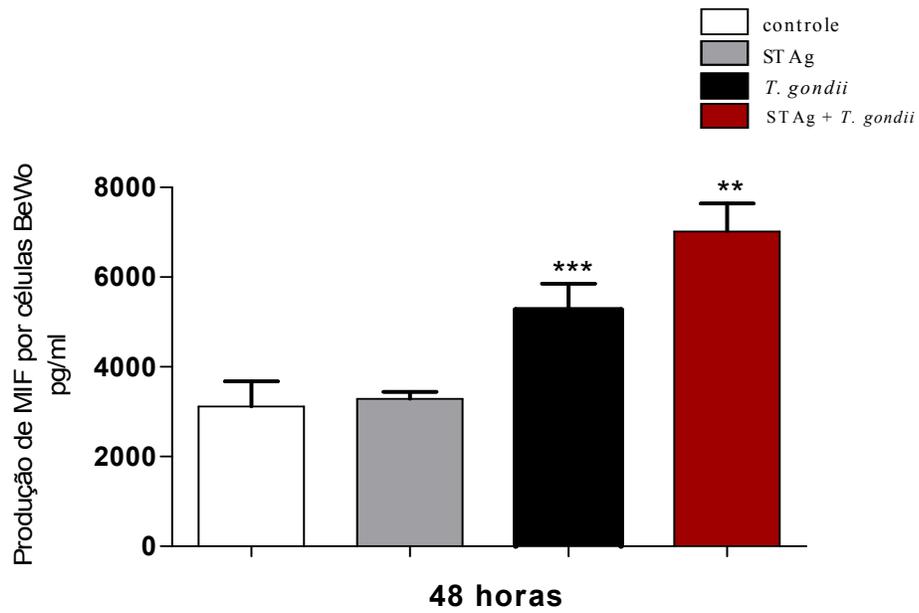


Figura 2

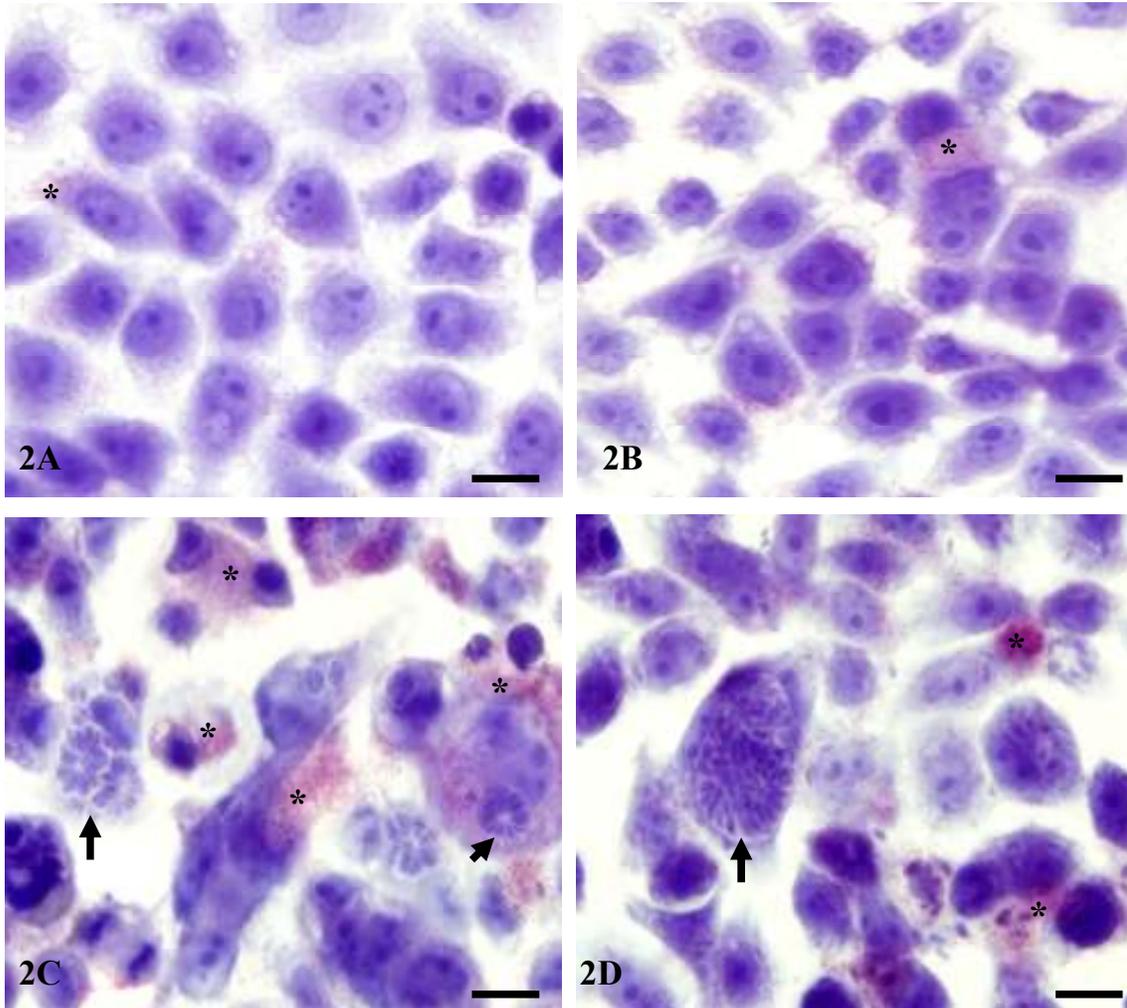


Figura 3A

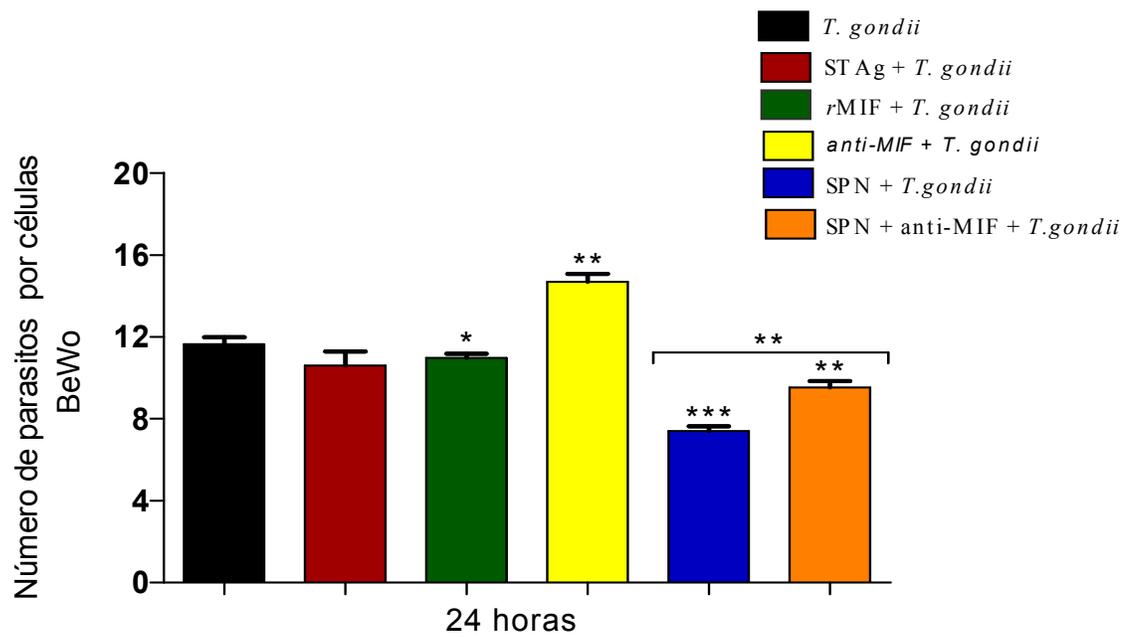


Figura 3B

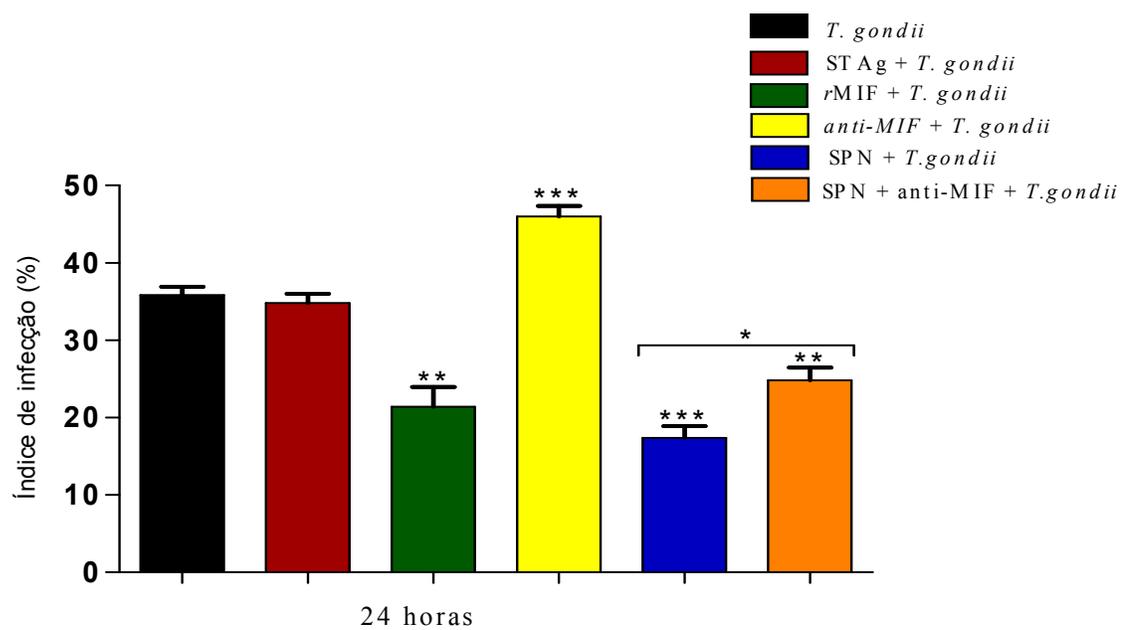


Figura 4

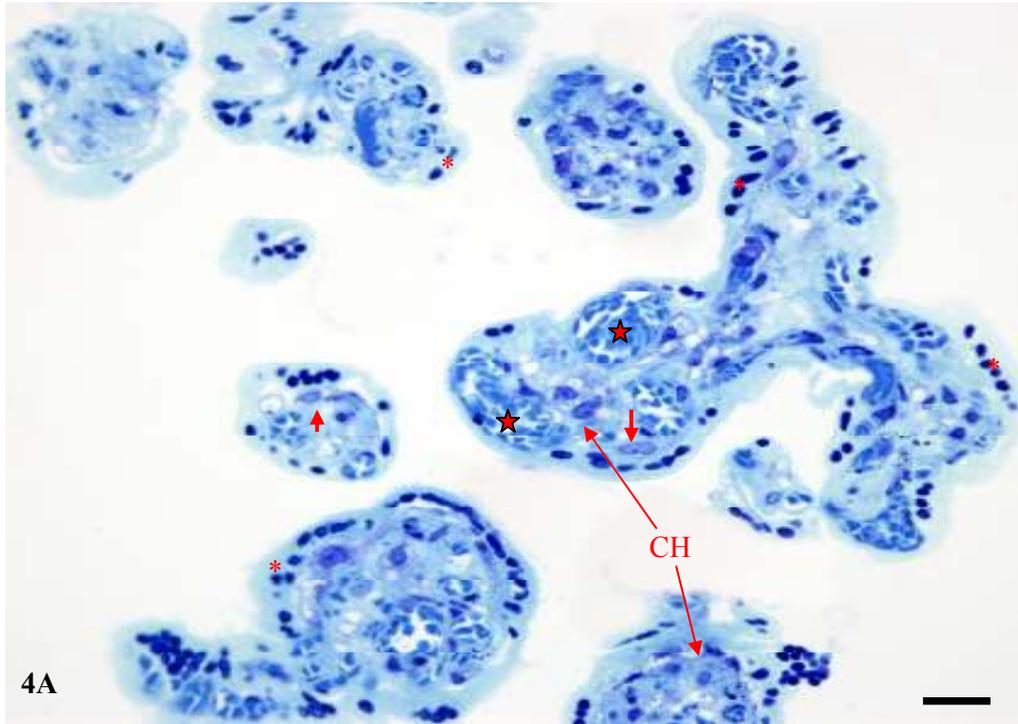


Figura 5

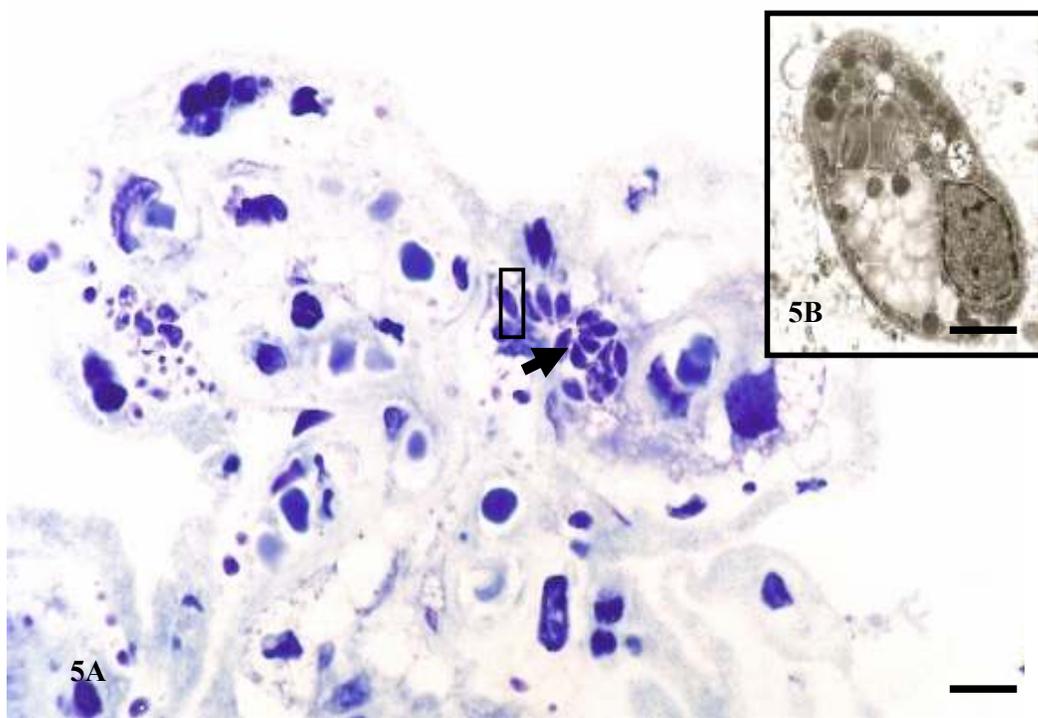


Figura 6

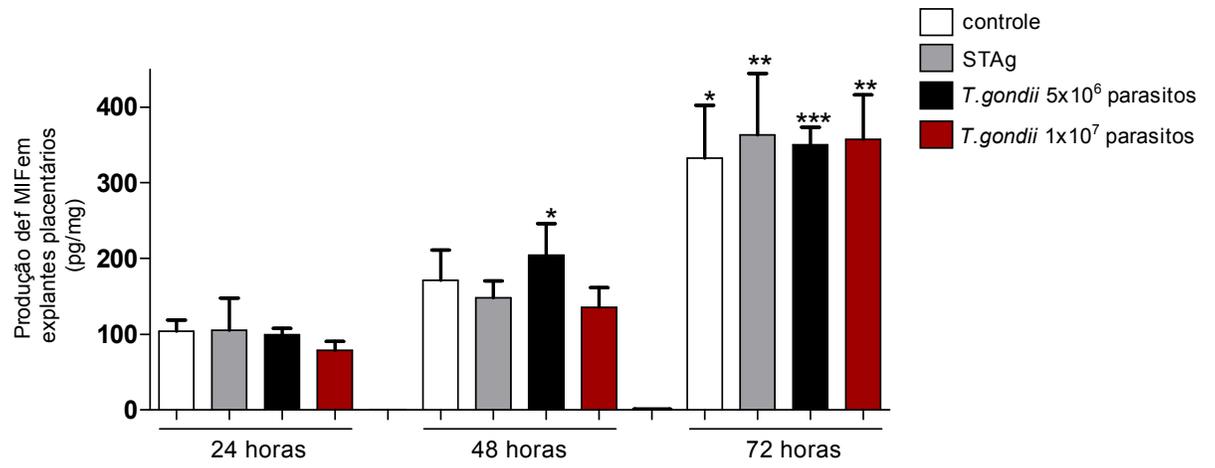
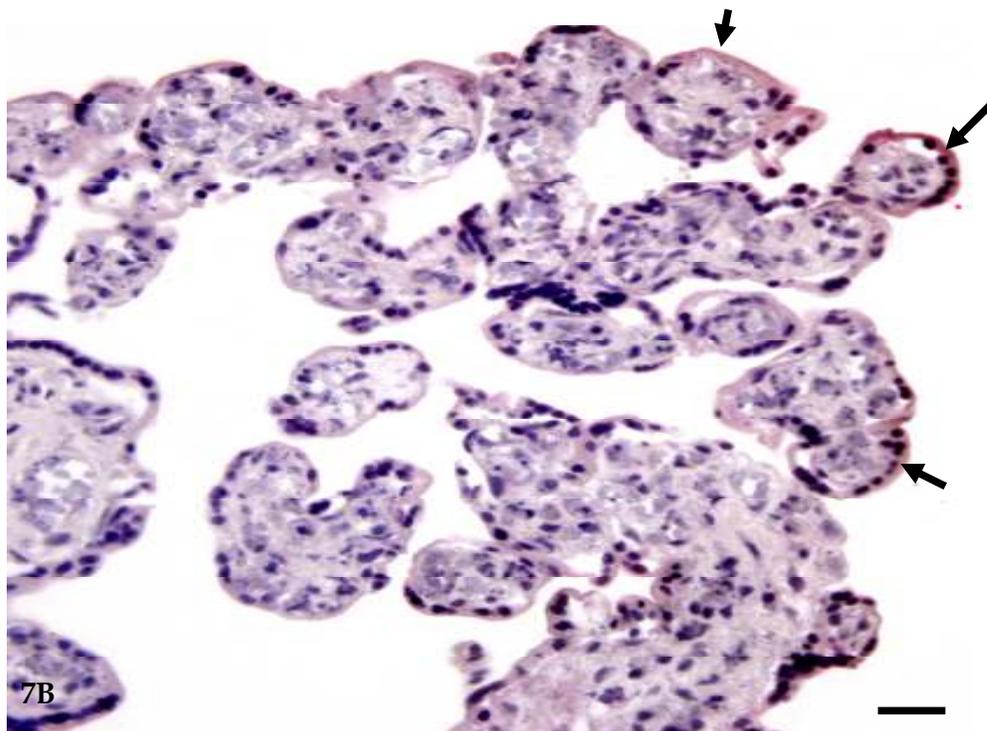
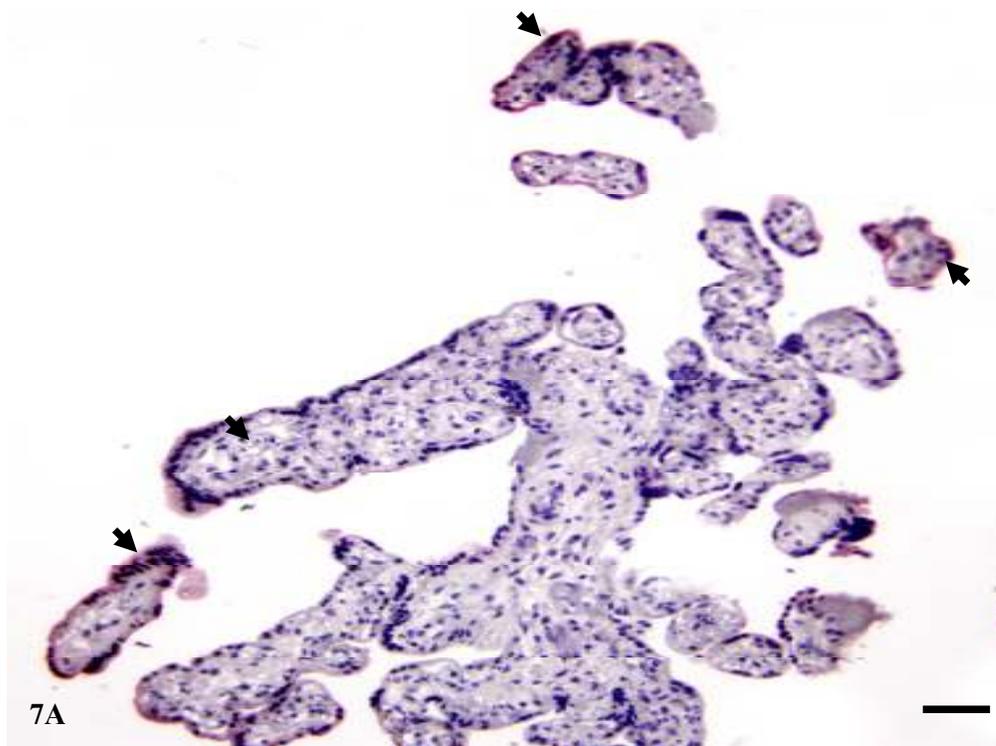


Figura 7



11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-BACAR, A. PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infect. Immun**, United States, v. 72, p. 1397-401, Mar, 2004.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **J Infect Dis.**, United States, v. 186, n° 5, p. 684-9, Sep, 2002.

ALJADA, A.; GARG, R.; GHANIM, H.; MOHANTY, P.; HAMOUDA, W.; ASSIAN, E.; DANDONA, P. Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action? **J Clin Endocrinol Metab.**, United States, v. 86, n° 7, p. 3250-6, Jul, 2001.

AMBROISE-THOMAS P., PELLOUX H. Toxoplasmosis-congenital and in immunocompromised patients : a parallel. **Parasitol Today**, England, v.9 (8), p. 61-63, Aug, 1993.

ANDO N, HIRAHARA F, FUKUSHIMA 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.**, United States, v. 40, n° 1, p. 48-56, Jul, 1998.

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

ARCURI, F.; BUCHWALDER, L.; TOTI, P.; CINTORINO, M.; TOSI, P.; LOCKWOOD, C.J.; RYBALOV, B.; SCHATZ, F. Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface. **Biol Reprod.**, United States, v. 76, n° 3, p. 433-439, Mar, 2007.

ARCURI F, CINTORINO M, CARDUCCI A, PAPA S, RIPARBELLI MG, MANGIONI S, DI BLASIO AM, TOSI P, VIGANÒ P. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. **Reproduction**. England, v. 131, n° 1, p. 175-82, Jan, 2006.

ARCURI, F.; CINTORINO, M.; VATTI, R.; CARDUCCI, A.; LIBERATORI, S.; PAULESU, L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. **Biol Reprod**, United States, v. 60, n° 6, p. 1299-1303, Jun, 1999.

ARCURI, F.; RICCI, C.; IETTA, F.; CINTORINO, M.; TRIPODI, S.A.; CETIN, I.; GARZIA, E.; SCHATZ, F.; KLEMI, P.; SANTOPIETRO, R.; PAULESU, L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, United States, v. 64, n° 4, p. 1200-1205, Apr, 2001.

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; JOHNSON, P.F.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by

preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. **J Immunol.**, United States, v. 167, n° 4, p. 2193-201, Aug, 2001.

BACHER, M.; MEINHARDT, A.; LAN, H.Y.; MU, W.; METZ, C.N.; CHESNEY, J.A.; CALANDRA, T.; GEMSA, D.; DONNELLY, T.; ATKINS, R.C.; BUCALA, R. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. **Am J Pathol.**, United States, v. 150, n° 1, p. 235-46, Jan, 1997.

BAHN, R.S.; WORSHAM, A.; SPEEG, K.V. JR; ASCOLI, M.; RABIN, D. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. **J Clin Endocrinol Metab.**, United States, v. 52, n° 3, p. 447-50, Mar, 1981.

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

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

BASS, K.E.; LI, H.; HAWKES, S.P.; HOWARD, E.; BULLEN, E.; VU, T.K.; MCMASTER, M.; JANATPOUR, M.; FISHER, S.J. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion in vitro. **Dev Genet.**, United States, v. 21, n° 1, p. 61-7, 1997.

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**, United States, v. 3, n° 3, p. 190-198, Sep, 1997.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. **Pathology of human placenta**, 4th, New York: Spriger, p. 921-922, 2000.

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

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

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, United States, v. 72, p. 248-54, May, 1976.

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

BOZZA, M.; SATOSKAR, A.R.; LIN, G.; LU, B.; HUMBLES, A.A.; GERARD, C.; DAVID, J.R. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. **J Exp Med.**, United States, v.189, n° 2, p. 341-6, Jan, 1999.

BUCALA, R. A most interesting factor. **Science**, United States, v. 409, p.146-7, Nov, 2000.

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; PANOPOULOS, A.D.; WATOWICH, S.S.; MURRAY, P.J.; DENKERS, E.Y. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. **J Immunol.**, United States v.174, n° 6, p. 3148-52. Mar, 2005.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; MITCHELL, R.A.; BUCALA, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of Macrophage Migration Inhibitory Factor. **J Exp Med**, United States, v. 179, p. 1895-1902, 1994.

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

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

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

CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol.** Germany, v. 73, n° 2, p.114-23, Jun, 1997.

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

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

CRONSTEIN, B.N.; KIMMEL, S.C.; LEVIN, R.I.; MARTINIUK, F.; WEISSMANN, G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, United States, v. 89, n° 21, p. 9991-5, Nov, 1992.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; VILLAGGIO, B.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S. Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis.**, England,; v. 57, n° 10, p. 573-577, Oct, 1998.

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

DAHER, S.; DE ARRUDA GERALDES DENARDI, K.; BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; RECK, A.P.; CAMANO, L.; MATTAR, R. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **J Reprod Immunol.**, Ireland, v. 62, n° 1-2, p. 151-7. Jun, 2004.

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

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

DONNELLY, R.P.; FREEMAN, S.L.; HAYES, M.P. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. **J Immunol.**, United States, p. 155, n° 3, p. 1420-7 Aug, 1995.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J. Comp. Path.**, England, v. 126, p. 79-94, Feb/Apr, 2002.

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

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

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E.P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A.A.; SHENOY, A.S.; TERRAZAS, L.I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A.R.; RODRIGUEZ-SOSA

M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.**, United States, v. 16, n° 22, p. 1-11, Jul, 2008.

FRICKER-HIDALGO, H.; PELLOUX, H.; RACINET, C.; GREFFENSTETTE, I.; BOST-BRU, C.; GOULLIER-FLEURET, A.; AMBROISE-THOMAS, P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures. *Placenta*, England, v. 19, n° 7, p. 545-9, Sep, 1998.

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

GAZZINELLI, R.T.; HAKIM, F.T.; HIENY, S.; SHEARER, G.M.; SHER, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J Immunol.** United States, v. 146, n° 1, p. 286-92, Jan, 1991.

GAVRILESCU, L.C.; DENKERS, E.Y. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. **J Immunol.**, United States, v. 167, n° 2, p. 902-9. Jul, 2001.

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

GOEBEL, S.; LÜDER, C.G.; GROSS, U. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. **Med Microbiol Immunol.**, Germany, v. 187, n° 4, p. 221-6, May, 1999.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, United States, p. 126, n° 1, p. 131-8, Oct, 1982.

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

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.**, United States, v. 164, n° 11, p. 5721-8, Jun, 2000.

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

HUPPERTZ, B.; KINGDOM, J.; CANIGGIA, I.; DESOYE, G.; BLACK, S.; KORR, H.; KAUFMANN, P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. **Placenta**, England, v. 24, n° 2-3, p. 181-90, Feb-Mar, 2003.

IETTA, F.; TODROS, T.; TICCONI, C.; PICCOLI, E.; ZICARI, A.; PICCIONE, E.; PAULESU, L. Macrophage migration inhibitory factor in human pregnancy and labor. **Am J Reprod Immunol.**, United States, v. 48, n. 6, p. 404-409, Dec, 2002.

JÜTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; RÖLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. **J Immunol.** United States, v. 16, n° 5, p. 2383-2390, Sep, 1998.

KANG, H.; REMINGTON, J.S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **J Immunol.** United States, v. 164, n. 5, p. 2629-34, Mar, 2000.

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

KIM, L.; DEL RIO, L.; BUTCHER, B.A.; MOGENSEN, T.H.; PALUDAN, S.R.; FLAVELL, R.A.; DENKERS, E.Y. P38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. **J Immunol.** United States, v. 174, n° 7, p. 4178-84, Apr, 2005

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

KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, England, v. 407, n° 6805, p. 789-95, Oct, 2000.

KRISHNAN, L.; GUILBERT, L. J. ; RUSSELL, A. S. ; WEGMANN, T. G. ; MOSMANN, T. R.; BELOSEVIC, M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- γ response and increased production of Th2 cytokines. **J. Immunol.**, United States, v. 156, p.644-652, 1996.

KUDO, V.; BOYD, C. A. R. Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. **Bioch. Bioph. Acta.**, Germany, v. 1500, p. 119-124, Jan, 2000.

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

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

LI, H.Y.; CHANG, S.P.; YUAN, C.C.; CHAO, H.T.; NG, H.T.; SUNG, Y.J. Establishment of an efficient method to quantify embryo attachment to endometrial epithelial cell monolayers. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, United States, v. 38, n° 9, p. 505-511, Oct, 2002.

LIBRACH, C.L.; WERB, Z.; FITZGERALD, M.L.; CHIU, K.; CORWIN, N.M.; ESTEVES, R.A.; GROBELNY, D.; GALARDY, R.; DAMSKY, C.H.; FISHER, S.J. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. **J Cell Biol.** United States, v. 113, n° 2, p. 437-49, Apr, 1991.

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

LOKE, Y.W.; KING, A.; BURROWS, T.D. Decidua in human implantation. **Hum Reprod.**, England, v. 10, p. 14-21, Dec, 1995.

LOKE, Y.W.; KING, A. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. **Mol Med Today.**, England, v. 3, n. 4, p. 153-9, Apr, 1997.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Biol Chem**, Germany, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUCCHI, N.W.; PETERSON, D.S.; MOORE, J.M. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by *Plasmodium falciparum*, **Malar J.**, England, v. 29, p. 7-42, Feb, 2008.

LÜDER, C.G.K.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol.**, Germany, v. 289, p. 219-37, 2005.

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 macrophage via interference with nuclear translocation of STAT1 α . **Eur. J. Immunol.** Germany, v. 31, n^o 5, p. 1475-1484, May, 2001.

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

LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. **Infect Immun.**, United States, v. 38, n^o 3, p.1164-71, Dec,1982.

LUJÁN, C.D. TRIQUELL, M.F.; SEMBAJ, A.; GUERRERO, C.E.; FRETES, R.E. *Trypanosoma cruzi*: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. **Exp Parasitol.**, United States, v.108, n^o 3-4, p. 176-81, Nov-Dec, 2004.

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

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

MASEK, K.S.; FIORE, J.; LEITGES, M.; YAN, S.F.; FREEDMAN, B.D.; HUNTER, C.A. Host cell Ca²⁺ and protein kinase C regulate innate recognition of *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci.**, England, v. 119, p. 4565-73, Nov, 2006.

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

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

MENENDEZ, C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. **Parasitol Today.**, England, v.11, n° 5, p. 178-83, May, 1995.

MILLER, R.K.; GENBACEV, O.; TURNER, M.A.; APLIN, J.D.; CANIGGIA, I.; HUPPERTZ, B. Human Placental Explants in Culture: Approaches and Assessments. **Placenta**, England, v. 26, n. 6, p. 439-448, Jul, 2005.

MITCHELL, R.A.; BUCALA, R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Semin Cancer Biol.**, England, v. 10, n° 5, p. 359-66, Oct, 2000.

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

MIYAURA, H.; IWATA, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **J Immunol**, United States, v. 168, p. 1087-1094, 2002.

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

MUNN, D. H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, United States, v. 281, n. 5380, p. 1191-1193, Dec, 1998.

NISHI, M.; HU, K.; MURRAY, J.M.; ROOS, D.S. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci.**, England, v. 121, p.1559-68, May, 2008.

NORWITZ, E.R.; SCHUST, D.J.; FISHER, S.J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med.**, United States, v. 345, n° 19, p. 1400-8, Nov, 2001.

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

ONODERA, S.; SUZUKI, K.; MATSUNO, T.; KANEDA, K.; TAKAGI, M.; NISHIHARA, J. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. **Immunology**, England, v. 92, n° 1, p. 131-7, Sep, 1997.

OSTENSEN, M. Sex hormone and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann. NY Acad. Sci.** United States, v. 876, p. 131, 1999.

PATTILLO, R.A.; GEY, G.O. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. **Cancer Res.** United States, v. 28, n° 7, p. 1231-6. Jul, 1968.

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

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

PINON, J.M.; FOU DRINIER, F.; MOUGEOT, G.; MARX, C.; AUBERT, D.; TOUPANCE, O.; NIEL, G.; DANIS, M.; CAMERLYNCK, P.; REMY, G.; FROTTIER, J.; JOLLY, D.; BESSIERES, M.H.; RICHARD-LENOBLE, D.; BONHOMME, A. Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. **J Clin Microbiol**, United States, v. 33(4), p. 878-884, 1995

POZZI, L.A.; WEISER, W.Y. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill tumor cells. **Cell Immunol**, v.145, n° 2, p. 372-379, Dec, 1992.

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

RAHMAN, A.N.; SNIBSON, K.J.; LEE, C.S.; MEEUSEN, E.N. Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surface molecules in the sheep endometrium. **J. Reprod. Immunol.**, Ireland, p. 64, p. 45-58, Dec, 2004.

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R.N.; SHER, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J Exp Med.**, United States, v.186, n° 11, p. 1819-1829, Dec, 1997.

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

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

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol, United States**, v. 18, p. 208-213, Apr, 1963.

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

RODRÍGUES-SOSA, M.; ROSAS, L.E.; DAVID, J.R.; BOJALIL, R.; SATOSKAR, A.R.; TERRAZAS, L.I. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. **Infect Immun.**, United States, v. 71, n. 3, p. 1247-1254, Mar, 2003.

ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. **Int J Clin Lab Res.**, Germany, v. 21, n° 2, p. 152-8, 1991.

SAYLES, P.C.; GIBSON, G.W.; JOHNSON, L.L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.** United States, v. 68, n° 3, p.1026-33, Mar, 2000.

SCHLÜTER, D.; LÖHLER, J.; DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. **J Neuroimmunol.**, Netherlands, v. 31, p. 185-198, Mar, 1991.

SHER, A.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R.T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol.**, United States, v.150, n° 9, p. 3982-3989, May, 1993.

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

SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; KRAHENBUHL, J. L. Macrophage interactions in toxoplasmosis, **Res. Immunol.**, France, v. 144, p. 38-40, Jan, 1993.

SIMON, C.; CABALLERO-CAMPO, P.; GARCÍA-VELASCO, J.A.; PELLICER, A. Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. **J Reprod Immunol.**, Ireland, v. 38, n. 2, p.169-93, 1998.

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

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

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

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

TSUI K-H, CHEN L-Y, SHIEH M-L, CHANG S-H, YUAN C-CY, LI HY. Interleucin-8 can stimulated progesterone secretion from human trophoblast cell line BeWo. **In vitro Cell Dev Biol-Animal**, United States, v. 40, p. 331-336, Nov/Dez, 2004.

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.**, England, v. 270, n° 2, p. 451-7, Sep, 1990.

ZHOU, Y.; FISHER, S.J.; JANATPOUR, M.; GENBACEV, O.; DEJANA, E.; WHEELLOCK, M.; DAMSKY, C.H. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? **J Clin Invest.**, United States, v. 99, n° 9, p. 2139-51, May, 1997.

ZOURBAS, S. Localization of pro-inflammatory (IL-12, IL-15) and anti-inflammatory (IL-11, IL-13) cytokines at the foetomaternal interface during murine pregnancy. **Clin Exp Immunol.**, England, v. 126, n. 3, p. 519-28, Dec, 2001.

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

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

WATSON, A.L.; PALMER, M.E.; BURTON, G. Human chorionic gonadotrophin release and tissue viability in placental organ culture. **Hum Reprod.**, England, v.10, n° 8, p. 2159- 2164, Aug, 1995.

WATSON, M. N. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J Biophys Biochem Cytol**, United Status, v. 4, n° 4, p. 475 - 478, Jul, 1958.

WEGMANN, T.G. Foetal protection against abortion: is it immunosuppression or immunostimulation? **Ann Immunol**, France, v.135, n ° 3, p. 309-312, Nov-Dec, 1984.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol Today**, England, v. 14, n° 7, p. 353-356, Jul, 1993.

WEISER, W.Y. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. **Proc Natl Acad Sci**. United States, v. 86(19), p.7522-61989, Oct, 1989.

WILDER, R.L. Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. **Ann. N Y Acad. Sci.**, United States, v. 840, p. 45, 1998.

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