

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Camundongos C57BL/6 apresentam maior índice de reabsorção fetal durante infecção
por *Toxoplasma gondii* em comparação com camundongos BALB/c**

LOYANE BERTAGNOLLI COUTINHO

Uberlândia – MG

Maior – 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Camundongos C57BL/6 apresentam maior índice de reabsorção fetal durante infecção por *Toxoplasma gondii* em comparação com camundongos BALB/c

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Neide Maria da Silva

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia – MG

Maior – 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail coipa@ufu.br
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Loyane Bertagnolli Coutinho

“Camundongos C57BL/6 apresentam maior índice de reabsorção fetal durante infecção por *Toxoplasma gondii* em comparação com camundongos BALB/c”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de maio de 2010.

Prof. Dr. Jane Lima dos Santos – UESC

Profª. Dra. Karine Rezende de Oliveira – UFU/Pontal

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Amaury e Regina, pelo amor incondicional, apoio, incentivo, carinho, compreensão e exemplo de perseverança. Obrigada pela paciência e por todos os esforços e concessões que fizeram para que eu pudesse realizar e concluir mais esta etapa. Vocês são os amores da minha vida!

Aos meus irmãos, Lucas, Dafne e André, minhas paixões! Obrigada por toda credibilidade e confiança. Obrigada por serem meus amigos e existirem na minha vida!

Daniel, uma pessoa especial! Obrigada pela cumplicidade nos momentos mais difíceis e por fazer as coisas normais se tornarem acima da média, sempre. Você me faz muito bem!

Amo muito todos vocês!

“Sou uma só, mas ainda assim sou uma. Não posso fazer tudo, mas posso fazer alguma coisa. Por não poder fazer tudo, não me recuso a fazer o pouco que posso”.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Neide Maria da Silva, por todos os ensinamentos e idéias. Obrigada por estar sempre presente em todos os momentos que precisei durante estes dois anos e meio de convivência e aprendizagem!

Agradeço a Prof^a Dr^a Eloisa Amália Vieira Ferro, por me co-orientar, por ter me ensinado a fazer as coletas do material do meu trabalho e pelas sugestões e opiniões, sempre muito pertinentes.

Agradeço a Prof^a Dr^a Deise Aparecida de Oliveira Silva, por me salvar nas análises estatísticas do meu trabalho, pelo auxílio e atenção durante a realização dos ELISAs e por todas as considerações feitas no meu exame de qualificação. Muito obrigada por toda ajuda!

Agradeço ao Prof Dr Jair Pereira Cunha Junior, pela importante colaboração na execução dos PCRs. Obrigada pelo interesse e atenção!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e estar sempre comigo.

Ao nosso grupo excepcional de trabalho, Xuxu, Paulo Victor e Diego. Sem vocês o desenvolvimento deste trabalho não teria graça e também não teria acontecido. Divido com vocês todo o mérito desta pesquisa. Obrigada por serem pessoas tão especiais e por toda ajuda durante todo o tempo. O que seria de mim se não fossem vocês para segurar os meus “bichinhos”?! Acima de tudo, ganhei amigos que não se encontram mais. Obrigada por tornarem todas as coisas mais agradáveis e por serem, antes de colegas de trabalho, meus amigos!

Angélica, não tenho palavras para te agradecer. Obrigada pela imensa ajuda e conforto que você me deu durante a execução deste trabalho. Obrigada pelo carinho e amizade!

Aos amigos da histologia, Bellisa, Lorena, Mariana, Priscila e Andressa, obrigada pelos momentos de descontração e pela convivência sempre muito agradável!

*Aos meus amigos de jornada, Nayhanne, Rosiane, Nágilla,
Daiane e Guilherme. Vocês são pessoas especiais! Sem vocês tudo
seria mais difícil.*

*A secretária Juscélia, aos técnicos, Rui, Fabrício, Marcelo,
Mariani e Eliete. Obrigada pelo carinho, apoio e ajuda de vocês.*

*As secretárias da Pós-graduação, Lucileide e Lucélia, obrigada
pela atenção.*

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPq.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Complexo Avidina-Biotina
ABTS - 2,2'-azino-bis-3-etil-benziazolina- ácido sulfônico
CBEA - Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais
d G- Dias de gestação
d I – Dias de infecção
DAB - Diaminobenzidina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
DP - Desvio padrão
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
ESA - antígeno excretório-secretório
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia-Granulócito-Macrófago
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
HE - Hematoxilina-Eosina
HMEC - Células endoteliais microvasculares humanas
IE - Índice ELISA
IFN- γ - Interferon- γ
IgG - Imunoglobulina
IL – Interleucina
iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível
LIF – Fator de inibição de leucemia
MCP-1 (CCL2) – Proteína quimiotática para monócito 1
MG – Minas Gerais
MIP-1- α (CCL3) – Proteínas inflamatória de macrófago 1 α
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
NG – Não gestante
NI – Não infectada
NK – Células Natural Killer
nNOS - Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Enzimas óxido nítrico sintases

OPD - O-fenilenodiamina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T - Solução salina tamponada com fosfato-Tween

PBS-TM - Solução salina tamponada com fosfato-Tween-Molico

PCR – Reação de cadeia da polimerase

SNC - Sistema Nervoso Central

T reg - Células T reguladoras

TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento β

Th – Células T helper

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TNFRp55 – Subunidade 55 do receptor do Fator de Necrose Tumoral

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

UNICAMP - Universidade de Campinas

USP - Universidade de São Paulo

VEG - fator de crescimento endotelial vascular

VPF – Fator de Permeabilidade Vascular

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Índice de reabsorção frente à infecção por <i>T. gondii</i>	36
Figura 1. Parasitismo tecidual no pulmão, cérebro, útero e placenta das fêmeas infectadas	38
Figura 2. Fotomicrografia representativa do útero/placenta de fêmeas de camundongos infectadas ou não com <i>T. gondii</i>	41
Figura 3. Escore inflamatório no pulmão de fêmeas de camundongos infectadas ou não com <i>T. gondii</i>	42
Figura 4. Escore inflamatório no SNC de fêmeas de camundongos infectadas ou não com <i>T. gondii</i>	43
Figura 5. Fotomicrografia representativa da presença de iNOS no útero/placenta de fêmeas de camundongos infectadas ou não com <i>T. gondii</i>	45
Figura 6. Fotomicrografia representativa da presença de mastócitos no útero/placenta de camundongos infectados ou não por <i>T. gondii</i>	48
Figura 7. Contagem de mastócitos totais, granulados e desgranulados no útero/placenta	49
Figura 8. Níveis de citocinas no soro dos animais nas diferentes condições experimentais	52
Figura 9. Detecção de IgG total, IgG1 e IgG2a nas amostras de soro de camundongos nas diferentes condições experimentais	54

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.2. Ciclo biológico	16
1.3. Epidemiologia da toxoplasmose	17
1.4. Características clínicas da toxoplasmose	19
1.5. Toxoplasmose congênita	20
1.6. Resposta imunológica durante a gestação	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais	28
4.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	28
4.3. Acasalamento de detecção de prenhez	28
4.4. Organismos infecciosos	29
4.5 Infecção experimental e resultados da gestação	29
4.6. Análises morfológicas	30
4.7. Imunohistoquímica para detecção de parasitos	30
4.8. Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)	31
4.9. Análises histológicas	31
4.10. Detecção de anticorpos IgG específicos anti- <i>T. gondii</i>	32
4.11. Detecção de isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti- <i>T. gondii</i>	32

4.12. Detecção de IFN-γ, TNF, IL-6 e IL-10 nas amostras de soro	33
4.13. Análise estatística	33
4.14. Normas de Biossegurança	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Índice de reabsorção fetal frente à infecção por <i>T. gondii</i>	35
5.2. Parasitismo tecidual no pulmão, cérebro, útero e placenta das fêmeas infectadas	37
5.3. Análise histológica do útero/placenta, pulmão e cérebro de fêmeas de camundongos infectadas com <i>T. gondii</i>	39
5.4. Detecção de iNOS no útero/placenta de fêmeas de camundongos infectadas ou não com <i>T. gondii</i>	44
5.5. Presença de mastócitos totais, granulados e desgranulados no útero/placenta	46
5.6. Níveis de citocinas no soro dos animais nas diferentes condições experimentais ..	50
5.7. Resposta imune humoral	53
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	66
8. BIBLIOGRAFIA	68
9. ANEXO I	76

RESUMO

A infecção por *Toxoplasma gondii* durante a gestação é associada com resultados adversos. Grupos de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram oralmente infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no 1º dia de gestação e sacrificados aos 8 e 19 dias após o inoculo. Outro grupo foi infectado no 14º dia de gestação e sacrificado 5 dias após a infecção. As fêmeas foram avaliadas quanto ao índice de aborto/reabsorção fetal, parasitismo tecidual, expressão de iNOS por imunohistoquímica e alterações inflamatórias no útero/placenta, pulmão e SNC. Foi observado que somente 1 fêmea C57BL/6 entre as 9 fêmeas infectadas e analisadas apresentou fetos no 19º dia de gestação e infecção, demonstrando altas taxas de reabsorção fetal. Esta linhagem também apresentou maior infiltração leucocitária no útero e alterações inflamatórias no pulmão aos 8 dias de gestação e infecção, além de maiores alterações inflamatórias no SNC aos 19 dias de gestação e infecção comparada à linhagem BALB/c. Além disso, algumas fêmeas C57BL/6 apresentaram focos de necrose nos sítios de implantação aos 8 dias de gestação e infecção. Esta linhagem apresentou maior carga parasitária no pulmão aos 8 dias de gestação e infecção e no SNC aos 19 dias de gestação e infecção comparadas às fêmeas BALB/c. Entretanto, o parasito foi raramente encontrado no útero e placenta em ambas as linhagens, independente do dia de infecção. Fêmeas C57BL/6 também demonstraram maior infiltração de mastócitos e maiores índices de desgranulação, aos 19 dias de gestação e infecção comparadas às fêmeas BALB/c. Animais C57BL/6 apresentaram maiores níveis de interferon- γ (IFN- γ) e de fator de necrose tumoral (TNF) nas amostras de soro aos 8 dias de gestação e infecção e menores níveis da interleucina-10 (IL-10) aos 19 dias de gestação e infecção em comparação aos BALB/c. Não observou-se diferença na expressão iNOS entre as linhagens, aos 8 ou 19 dias de gestação e infecção, indicando que iNOS não está relacionada com as ocorrências de aborto. Nossos dados sugerem que os maiores prejuízos gestacionais observados na linhagem C57BL/6 podem estar associados às maiores alterações inflamatórias no útero/placenta e maiores níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias ao invés da própria presença do parasito. Ainda, os maiores danos gestacionais ocorrem quando a infecção acontece nos estágios precoces da gestação, sendo a linhagem C57BL/6 mais suscetível do que a linhagem BALB/c.

Palavras-chave: Aborto, BALB/c, Citocinas, C57BL/6, Inflamação, mastócitos, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

The *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy is associated with adverse pregnancy outcome. Groups of C57BL/6 and BALB/c females were orally infected with 5 cysts of ME49 strain of *T. gondii* on day 1 of pregnancy and sacrificed on days 8 and 19 after. Another group was infected on day 14 of pregnancy and sacrificed 5 days later. The females were evaluated for resorption ratio, tissue parasitism, expression of iNOS by immunohistochemistry and inflammatory changes in the uterus/placenta, lungs and CNS. It was observed that only one C57BL/6 from 9 pregnant and infected animals presented fetuses on day 19 of pregnancy and infection, meaning high resorption rate. This lineage of mice also presented higher leukocyte infiltration in the uterus and inflammatory changes in the lung on day 8 of pregnancy and infection, and higher inflammatory changes in the CNS on day 19 of pregnancy and infection when compared to BALB/c mice. In addition, some females of the C57BL/6 mice presented necrotic foci in the implantation sites on day 8 of pregnancy and infection. Furthermore, C57BL/6 mice showed higher number of parasites in the lungs on day 8 of pregnancy and infection and in the CNS on day 19 of pregnancy and infection compared to BALB/c mice. However, the parasite was seldom found in the uterus and placenta in both lineages of mice irrespective of the day of infection. C57BL/6 mice also demonstrated higher mast cell infiltration and higher degranulation index on day 19 of pregnancy and infection, compared to BALB/c mice. C57BL/6 presented higher interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF) levels in serum samples on day 8 of pregnancy and infection and lower interleukin-10 (IL-10) levels on day 19 of pregnancy and infection compared to BALB/c mice. Concerning iNOS expression, there was no difference in the enzyme expression between C57BL/6 and BALB/c lineages on day 8 or 19 of pregnancy and infection, indicating that iNOS is not related to the occurrence of abortion. Our data suggest that the worst pregnancy outcome observed in C57BL/6 mice could be associated to the higher inflammatory alterations in the uterus/placenta and higher proinflammatory cytokine levels systemically better than presence of the parasite in this site of infection. Additionally, the major impaired pregnancy outcome occurs when the infection happens in the early phase of the pregnancy, and this result is related to the genetic background of mice, being the C57BL/6 more susceptible than BALB/c mice.

Key words: Abortion, BALB/c, Cytokines, C57BL/6, Inflammation, mast cell, *Toxoplasma gondii*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, responsável por infecções congênitas e abortos, bem como infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos (UNNO; KITO; TAKASHIMA, 2010). Este parasito é um organismo notável uma vez que um terço da população mundial apresenta anticorpos contra o parasito e a soroprevalência aumenta com a idade e varia de acordo com a distribuição geográfica em todo o mundo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Entre as espécies de parasitos de animais, *T. gondii* se encontra como uma das mais comuns e bem conhecidas, sendo capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, inclusive humanos e, apesar da maioria dos parasitos terem seus hospedeiros específicos e somente transmitidos por meio de ciclo fecal-oral, *T. gondii* pode, também, ser transmitido via transplacentária e ainda por meio de canibalismo, o que justifica sua ampla distribuição e elevada soroprevalência (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; JONES; DUBEY, 2010).

As espécies que fazem parte do filo Apicomplexa possuem algumas características em comum, dentre elas a presença de um complexo apical de estruturas de citoesqueleto especializadas, além de organelas de secreção como roptrias e micronemas, as quais, juntamente com os grânulos densos, são responsáveis pelo reconhecimento da célula hospedeira, além de fixação, invasão, estabelecimento e manutenção do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997).

O parasito apresenta três formas distintas e infectantes: esporozoítas contidos em oocistos, taquizoítas, que representam o estágio de multiplicação rápida do parasito e, sob pressão do sistema imunológico, dão origem aos bradizoítas, de crescimento lento, que ficam contidos na forma de cistos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais como pulmão, fígado e rins, eles são mais prevalentes em tecidos musculares e neurais, inclusive cérebro, olho e músculos esqueléticos e cardíacos (JONES; DUBEY, 2010). Esta estrutura de cisto pode permanecer de forma latente durante toda a vida (MILLER et al., 2009).

As cepas de *T. gondii* isoladas em humanos e outros animais na Europa e América do Norte são classificadas em três linhagens genéticas (Tipos I, II e III) consideradas clonais e com baixa diversidade genética, porém, isolados de *T. gondii* do Brasil são geneticamente diferentes daqueles da Europa e América do Norte, com traços biológicos distintos, sendo

estas cepas atípicas da América do Sul denominadas cepas “exóticas” pertencentes a diversos haplogrupos que são endêmicos da América do Sul (LEHMANN et al., 2006; KHAN et al., 2007; PENA et al., 2008).

As cepas do tipo I são altamente virulentas para camundongos e possivelmente humanos (GRIGG et al., 2001) enquanto que as cepas do tipo II e III são relativamente menos virulentas (SIBLEY et al., 1992; HOWE et al., 1996, 1997).

Considerando a infecção por *T. gondii* em humanos, na Europa e América do Norte a maioria dos casos de toxoplasmose e toxoplasmose congênita está associada com a cepa do tipo II, com baixas proporções das cepas tipos I e III (HOWE et al., 1997; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009). Na América do Sul, tanto os casos assintomáticos quanto os clínicos, são associados com alta incidência da cepa do tipo I (FERREIRA et al., 2008). No entanto, devido à alta diversidade genética das cepas recombinantes de *T. gondii* isoladas no Brasil, a toxoplasmose adquirida e congênita pode provavelmente ocorrer com todas estas cepas (FUX et al., 2003; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

1.2. Ciclo biológico

O ciclo de vida de *T. gondii* apresenta uma fase sexuada, que ocorre somente no intestino dos hospedeiros definitivos (felídeos) e resulta na excreção de oocistos nas fezes destes animais, e uma assexuada, que ocorre nos hospedeiros intermediários (MILLER et al., 2009).

A fase sexuada do ciclo inicia-se com a ingestão de cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas e acontece nas células epiteliais do intestino delgado dos felídeos (BOOTHROYD, 2009), sendo que o ciclo induzido pela ingestão de cistos teciduais, contendo bradizoítas, é o mais elucidado, no qual a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago dos animais promovendo a liberação dos bradizoítas que penetram nas células epiteliais do intestino e começam a se multiplicar por um processo denominado endodiogenia (merogonia) com conseqüente formação de merozoítas no interior de vacúolos parasitóforos (DUBEY; LINDSAY; SPERR, 1998; DUBEY, 2004).

Quando ocorre rompimento da célula infectada, os merozoítas são liberados e penetram em outras células epiteliais dando origem as formas sexuadas (masculina e feminina) que após processo de maturação formam gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas) os quais saem da célula e fecundam os macrogametas. Após a fertilização, há formação de uma parede externa ao redor do zigoto originando o oocisto

imaturado que é liberado nas fezes dos hospedeiros definitivos (FERGUSON, 2002; DUBEY, 2004).

A maturação do oocisto no meio externo ocorre por meio de um processo denominado esporogonia, originando esporozoítas no interior do oocisto, tornando-o infectante aos hospedeiros (FERGUSON, 2002). A ocorrência da infecção dos hospedeiros intermediários se dá por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos, ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas (BOOTHROYD, 2009), ingestão de taquizoítas por meio de líquidos biológicos (saliva, esperma, leite), transplantes de órgãos ou infecções transplacentárias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Nestes hospedeiros distinguem-se duas fases de infecção, sendo uma fase aguda na qual o parasito sofre intensa multiplicação por processo de endodiogenia e forma vacúolos parasitóforos os quais rompem as células parasitadas e liberam taquizoítas que por sua vez irão invadir novas células e assim sucessivamente. A fase crônica é determinada quando os mecanismos imunológicos atuam no sentido de diminuir a proliferação dos parasitos promovendo a evolução das formas taquizoítas para bradizoítas e consequente formação de cistos. (FERGUSON, 2002; 2009a).

1.3. Epidemiologia da toxoplasmose

Na década de 1950, *Toxoplasma* ficou conhecido por ser a causa de sérias doenças nos humanos devido à transmissão congênita. Além disso, com o desenvolvimento de testes sorológicos foi possível identificar que a infecção é muito difundida, com alta prevalência em humanos e animais domésticos em todo o mundo (FERGUSON, 2009b).

Sendo prevalente na maioria das áreas do mundo, *T. gondii* tem importância médica e veterinária porque causa abortos e doenças congênitas nos seus hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WIESS, 2000).

Apesar de ocorrer no mundo todo, a incidência de *T. gondii* é alta em áreas tropicais e decresce com o aumento da latitude (EVENGARD et al., 2001), ou seja, a soroprevalência é baixa em regiões frias e áreas áridas e muito quentes (JONES et al., 2001). A infecção por este parasito é comum na América do sul e um estudo feito no Brasil demonstrou que a soroprevalência é alta em pessoas com baixas condições sócio-econômicas, provavelmente devido à transmissão oral (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

A transmissão congênita da toxoplasmose ocorre quando a mulher adquire a infecção durante o período gestacional (JONES et al., 2001) ou numa reagudização da doença durante

este período. Estima-se que, mundialmente, de cada 1000 nascimentos, 3 – 8 bebês são infectados intra-uterinamente e a prevalência de mulheres, em idade gestacional, soropositivas para *T. gondii* é de 15% nos Estados Unidos, 58% na Europa Central, 51 – 72% na América Latina e 54 – 77% em países africanos (RORMAN et al., 2006).

Um estudo realizado em Uberlândia (MG) demonstrou diferenças significantes entre dados obtidos de hospital particular e público no que diz respeito à idade materna, cidade de origem, idade gestacional, número de visitas ao médico durante a gestação, tipo de parto e peso do bebê ao nascer. A soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas pacientes atendidas em hospital público foi de 57,6%, enquanto que naquelas atendidas em hospital particular foi de 41,9%. Além disso, a frequência de toxoplasmose congênita obtida a partir da detecção de anticorpos IgM e/ou IgG específicos anti-*T. gondii* em amostras de cordão umbilical foi exclusivamente observada nas amostras obtidas a partir de pacientes atendidas em hospital público (0,8%) enquanto que nenhuma amostra positiva foi observada a partir de pacientes atendidas em hospital particular (0%), demonstrando ainda diferenças entre populações de níveis sócio-econômicos distintos (SEGUNDO et al., 2004a; 2004b).

Os riscos da infecção intrauterina para o feto da manifestação da toxoplasmose congênita e a gravidade da doença dependem do momento da infecção materna ao longo da gestação, da competência imunológica da mãe durante a parasitemia, do número e virulência dos parasitos transmitidos ao feto e da idade do feto no momento da transmissão. Se a mãe adquire a infecção durante a gestação e não é tratada, o risco da infecção intrauterina para o feto aumenta de 14% quando a infecção ocorre no primeiro trimestre, para 59% quando a infecção ocorre no último trimestre (REMINGTON; DESMONTS, 1990; CHATTERTON, 1992).

Estimativas baseadas em estudos sorológicos sugerem que a incidência da infecção materna adquirida durante a gestação apresenta taxas que variam de 1 a 310 a cada 10.000 gestantes em diferentes populações da Europa, Ásia, Austrália e Américas. Essas taxas dependem da prevalência da infecção na população estudada e são ligeiramente superiores (6 – 210 em 10.000) se somente as mulheres susceptíveis são levadas em conta, por exemplo, aquelas mulheres que não desenvolvem imunidade antes da concepção. As incidências da infecção pré-natal por *T. gondii* na mesma população ou em populações similares têm sido estimadas em taxas de 1 a 120 a cada 10.000 nascimentos (TENTER; HECKEROTH; WIESS, 2000).

Cerca de 67 - 80% das crianças infectadas por transmissão vertical apresentam a infecção subclínica e podem ser diagnosticadas através de métodos sorológicos ou laboratoriais. Embora essas crianças pareçam saudáveis ao nascimento, elas podem desenvolver sintomas

clínicos e deficiências em momentos mais tardios da vida. Essas deficiências afetam predominantemente os olhos, provocando retinocoroidites, estrabismos e cegueira, sistema nervoso central, provocando deficiências psicomotoras e neurológicas, convulsões e retardo mental ou os ouvidos, provocando surdez (REMINGTON; DESMONTS, 1990; CHATTERTON, 1992).

Uma vez que *T. gondii* pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário, do intermediário para o definitivo, bem como entre hospedeiros definitivos e entre hospedeiros intermediários, ainda não se sabe qual das várias vias de transmissão é epidemiologicamente mais importante (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000). É provável que a ampla distribuição e alta prevalência de *T. gondii* se dê por uma interação de todas as vias de transmissão (HIDE et al., 2009).

Sendo assim, a prevalência da infecção por *T. gondii* não é confinada à presença de certas espécies de hospedeiros e o ciclo do parasito pode continuar indefinidamente por transmissão de cistos teciduais entre hospedeiros intermediários, mesmo na ausência de hospedeiros definitivos, e também por transmissão de oocistos entre hospedeiros definitivos, mesmo na ausência de hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000).

Deste modo, a prevalência mundial do parasito é muito alta entre os animais de sangue quente, variando desde pássaros a uma diversidade de mamíferos, mesmo aqueles que vivem exclusivamente no mar, o que torna *T. gondii* único entre os agentes eucariotas infecciosos (BOOTHROYD, 2009).

1.4. Características clínicas da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *T. gondii*, sendo uma protozoonose de ampla distribuição geográfica, não restrita às regiões tropicais e subtropicais e estima-se que aproximadamente 25% da população mundial apresenta-se infectada por este parasito (SPALDING; AMENDOEIRA; CAMILO-COURA, 2003; FERREIRA et al., 2004).

No Brasil, pesquisas sorológicas revelam que 50 – 80% da população apresenta sorologia positiva para *T. gondii* (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003) enquanto que na Europa a soroprevalência é maior que 54% (PETERSEN, 2007). As variações de soroprevalência estão correlacionadas aos hábitos alimentares e higiênicos da população (REMINGTON; KLEIN, 2001).

Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose geralmente cursa de forma assintomática (GROSS et al., 2004) mas podem ocorrer adenopatias, principalmente cervicais,

freqüentemente acompanhadas de febre baixa, desânimo e anorexia. Esse quadro é de evolução benigna e, na maioria dos casos, tem resolução espontânea no final de duas a quatro semanas, mas pode persistir ou recorrer por até um ano (ANDRADE et al., 2004).

Esta doença apresenta quadro grave de evolução em indivíduos imunocomprometidos e mulheres gestantes, nas quais a presença do parasito está associada à mortalidade e má formação congênita, distinguindo estes dois grupos de alto risco (SOUSA et al., 1988; REMINGTON et al., 2001). Os indivíduos imunocomprometidos, principalmente os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), câncer, doenças auto-imunes, transplantados de órgão sólido ou medula óssea podem apresentar quadro sistêmico grave durante a infecção aguda ou, mais comumente, por recrudescimento de uma infecção crônica (ANDRADE et al., 2000).

As manifestações clínicas e a gravidade da infecção dependem da interação entre o parasito e o hospedeiro, incluindo a virulência da cepa, a carga parasitária e a via de infecção, da capacidade de resposta imune (humoral e celular) do hospedeiro, da integridade das mucosas e das barreiras epiteliais, da idade e das características genéticas do hospedeiro (RORMAN et al., 2006).

1.5. Toxoplasmose congênita

A transmissão vertical, não acontece sempre, mas ocorre em 20 - 50% das infecções maternas primárias por *T. gondii* durante a gestação (JONES et al., 2001). Essa probabilidade aumenta com o avanço da gestação, portanto, mulheres que adquirem a infecção durante o primeiro trimestre são menos prováveis de transmitir o parasito para os fetos do que aquelas infectadas durante o terceiro trimestre de gestação. No entanto, as conseqüências para o feto são mais graves quando a infecção materna é adquirida no início da gestação, provocando frequentemente a morte fetal no útero e abortos espontâneos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Além do período de gestação, as conseqüências da toxoplasmose materna para o feto dependerão, também, do grau de exposição do feto ao parasito e da virulência da cepa (RORMAN et al., 2006).

Se a mulher adquire a infecção durante a gestação, *T. gondii* pode ser transmitido ao feto e causar lesões inflamatórias que podem provocar danos neurológicos permanentes, com ou sem hidrocefalia, e coriorretinites com prejuízos visuais. A mulher gestante e o recém-nascido

infectados são normalmente assintomáticos, embora a criança apresente o risco de desenvolver coriorretinite recorrente posteriormente na vida (PETERSEN, 2007).

A patogenicidade de *T. gondii* na infecção fetal não é totalmente esclarecida, tem-se proposto que as alterações imunológicas na interface materno-fetal, como falhas no balanço da produção de citocinas relacionadas com células Th1 e Th2, podem aumentar o risco da infecção fetal (LIN, et al., 1993; ABOU-BACAR et al., 2004a).

Um estudo prévio, realizado em ovelhas gestantes infectadas com *T. gondii*, demonstrou que todos os filhotes que nasceram estavam comprovadamente infectados, porém, não houve nenhuma evidência de infecção nos tecidos daqueles que foram abortados durante a fase aguda da infecção, sugerindo que o aborto ocorre antes da placenta ou do feto serem invadidos pelo parasito. Sendo assim, os abortos induzidos por *T. gondii* na fase aguda da infecção são improváveis de serem diagnosticados a partir de tecidos fetais. Isto tem implicações não só para o diagnóstico de abortos em ovinos, mas também para a compreensão da patogênese dos abortos provocados pelo parasito (OWEN; CLARKSON; TRESS, 1998).

A infecção por *T. gondii* na gestação pode, portanto, acarretar o acometimento fetal provocando abortos, retardo do crescimento intra-uterino, morte fetal, prematuridade e a síndrome da toxoplasmose congênita: retardo mental, calcificações cerebrais, microcefalia, hidrocefalia, coriorretinite, hepatoesplenomegalia, o que torna a toxoplasmose congênita umas das formas mais graves da doença (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.6. Resposta imunológica durante a gestação

Numa gestação normal o estado imunológico materno é caracterizado, preferencialmente, por um perfil Th2, quando citocinas anti-inflamatórias como Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL5), Interleucina-10 (IL10) e Fator de Transformação de Crescimento β (TGF- β) são produzidas por diferentes células, inclusive de natureza fetal. Qualquer disfunção desse estado imunológico pode potencializar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), altamente prejudiciais à gestação (LUPPI, 2003; RAGHUPATHY, 2001). Segundo Lin e colaboradores (1993), IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 são sintetizadas na interface materno-fetal murina, principalmente por células da decídua e da placenta fetal em todo o período gestacional.

As citocinas do perfil de resposta Th2, como IL-10, são essenciais para a tolerância materna ao embrião já que exercem função anti-inflamatória e imunossupressora, inibindo a

produção de citocinas desfavoráveis, além de tornar inativas as funções dos monócitos/macrófagos e de células “Natural Killer” (NK), bem como inibir, direta ou indiretamente, células TCD8⁺ (LIN et al., 1993; KRISHNAN et al., 1996a).

Deste modo, as citocinas produzidas por células de perfil Th2, incluindo IL-10 e TGF- β 2 são importantes para a manutenção da gestação por meio de efeitos imunossupressores, enquanto que citocinas de perfil Th1 como IFN- γ e TNF- α são responsáveis pela indução de aborto (KRISHNAN et al., 1996b). Estudos realizados com camundongos machos da linhagem DBA/2J acasalados com fêmeas CBA/J demonstraram que os abortos murinos (reabsorção fetal) são caracterizados por necrose local induzida por TNF- α na junção do trofoblasto fetal com a decídua, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, trombose e hemorragia (JOACHIM et al., 2001).

No processo de gestação, os hormônios sexuais são essenciais para a proliferação e decidualização do endométrio. Após a ovulação, a progesterona transforma o endométrio em uma estrutura essencialmente secretora, sendo que essas secreções são de suma importância para o processo de implantação e/ou desenvolvimento do blastocisto, resultado de um perfeito equilíbrio hormonal estrógeno-progesterona durante o ciclo menstrual (D’ HAUTERIVE et al., 2002). Estudos comparando útero e cérvix uterino entre ratos gestantes e não gestantes no período pré-parto demonstram que além da progesterona inibir o parto espontaneamente, também inibe o aumento da produção de óxido nítrico no cérvix uterino. Deste modo, a regulação dos mecanismos geradores de NO pelo cérvix e útero está diretamente modulada por hormônios esteróides ou por eventos indiretos desencadeados pela ausência da progesterona (BUHIMSCI et al., 1996).

O NO é produzido pelas células dos mamíferos envolvidas com a resposta imune, como macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, neutrófilos e células NK durante o metabolismo da L-arginina por meio de uma família de isoenzimas conhecidas por NO sintases (NOS) (COLEMAN, 2001). Dentre as atividades biológicas do NO incluem: vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, neurotransmissão, plasticidade neural, modulação da inflamação e funções imunológicas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

De acordo com os estudos de Buhimsci e colaboradores (1996) a baixa regulação na produção de NO no útero durante o trabalho de parto é acompanhada por uma regulação positiva da geração de NO no cérvix uterino, o qual pode estar envolvido na remodelagem do tecido conjuntivo, além disso, as 3 isoenzimas (NOS) estão presentes no cérvix e, neste local,

o sistema é regulado positivamente durante o processo de parto pelo aumento na quantidade de expressão de iNOS e nNOS. Segundo Garfield e colaboradores (1998) o NO é um mediador local importante no útero e cérvix uterino durante a gestação e parto por ser um possível elemento no controle da quiescência uterina e funções cervicais durante a gestação e parto. Além disso, NO previne a desgranulação de mastócitos, liberação de mediadores e expressão de citocinas (COLEMAN, 2002).

Frente a infecção por *T. gondii* iNOS é ativada em resposta a citocinas como IFN- γ e TNF- α e IL-1 β para produzir altas concentrações de NO, que é a forma associada com as respostas a infecções parasitárias uma vez que NO pode matar diretamente os taquizoítas deste parasito por meio da inibição de enzimas nucleares e mitocondriais essenciais a sobrevivência do parasito (BRUNET, 2001).

Durante a gestação é essencial que nutrientes suficientes sejam fornecidos pelo sistema vascular para suportar as modificações pelas quais o cérvix uterino se submete. Nesse contexto, o processo de angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma micro-circulação pré-existente, está associado aos mastócitos (VARAYOUD et al., 2004), uma vez que a desgranulação destas células está relacionada com a expressão de mRNA para o fator de crescimento endotelial vascular (VEG-F) (BOSQUIAZZO et al., 2007).

Os mastócitos desempenham importantes funções como células efetoras frente a respostas inflamatórias. Os grânulos pré-formados que são liberados após cinco minutos depois do contato com o antígeno contêm histamina, proteoglicanas e proteases neutras em várias composições. Entre cinco a trinta minutos após esse contato são produzidos mediadores derivados de lipídeos, inclusive metabólitos do ácido araquidônico por meio da ciclo-oxigenase e lipoxigenase. Além disso, várias citocinas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF e TGF- β) e quimiocinas MIP-1- α (CCL3), MCP-1 (CCL2) são sintetizadas e secretadas pelos mastócitos em torno de uma hora após o contato com o antígeno, e esses mediadores possuem funções complexas e parcialmente redundantes nas respostas inflamatórias agudas e tardias (MAYRL; ZUBERIL; LIU, 2003). Este tipo celular também desempenha funções reguladoras na resposta imune por meio de sua habilidade em secretar vários mediadores e citocinas e apresentam influência nas funções das células B e T, além de ser a principal fonte de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, as quais sinalizam células T *naive* e de memória para se diferenciarem preferencialmente em células do perfil Th2. Ainda, os mastócitos podem apresentar antígenos às células T e, em humanos, podem

estimular diretamente a síntese de IgE pelas células B (MAYRL; ZUBERIL; LIU, 2003). Dados recentes consideram os mastócitos como reguladores das respostas imunes fisiológicas e patológicas e, assim, atuantes na interface entre imunidade inata e adaptativa assumindo diferentes funções e comportamentos em momentos distintos da resposta imune (FROSSI et al., 2010).

Estudos com camundongos C57BL/6 gestantes e infectados por *T. gondii* demonstraram que os níveis de expressão de mRNA para Foxp3 nos esplenócitos e na placenta diminuem consideravelmente durante o processo da infecção e o número de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ esplênicas e células Foxp3⁺ na placenta diminuiu de forma sincronizada nos camundongos infectados pelo parasito. Isto sugere que a perda fetal provocada por *T. gondii* pode ocorrer independentemente da transmissão vertical e que a diminuição de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ durante a infecção pode representar um possível mecanismo para a patogênese do aborto provocada por este parasito (GE et al., 2008).

Desta maneira, os componentes normais da resposta imune materna frente a uma infecção podem comprometer a gestação nos diferentes estágios da gravidez (KRISHNAN et al., 1996b). Sendo assim, embora existam diversos estudos que indicam que a infecção por *T. gondii* pode resultar em aborto, sem necessariamente ocorrer a transmissão do parasito para o feto, os mecanismos moleculares que desencadeiam o processo de aborto permanecem desconhecidos.

2. JUSTIFICATIVA

T. gondii é causa de infecção congênita em humanos e ovinos e é notável devido à alta prevalência, uma vez que um terço da população mundial apresenta anticorpos contra o parasito. Em indivíduos imunocompetentes a doença cursa de maneira assintomática, porém, indivíduos imunocomprometidos e mulheres gestantes apresentam quadro grave de evolução, destacando os 2 grupos de risco da doença, sendo que nas mulheres gestantes a presença do parasito está associada à mortalidade e má formação congênita.

Considerando que a gestação se caracteriza por um processo complexo e que sua manutenção depende de um perfil de citocinas Th2, a infecção por *T. gondii* pode comprometê-la a partir de um desvio do perfil para Th1 com produção de citocinas pró-inflamatórias e que, potencialmente provoquem abortos. Além disso, os estudos envolvendo tal assunto são dificultados, principalmente *in vivo*, devido às questões éticas, sendo necessárias pesquisas em modelos animais relacionadas aos eventos moleculares, citocinas, fatores e substâncias envolvidas na interface materno-fetal durante a gestação e infecção por *T. gondii*.

Sabendo que a infecção por *T. gondii* durante a gestação acarreta comprometimento fetal ou provoca morte do feto no útero e aborto espontâneo e que os mecanismos envolvidos não são bem elucidados, propõe-se um modelo de estudo comparativo entre as linhagens C57BL/6 (suscetíveis) e BALB/c (resistentes) para avaliar a relação entre a infecção materna e os índices de aborto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho experimental foi analisar a influência da infecção por *T. gondii* adquirida no início e terço final da gestação, no resultado da mesma em fases precoces e tardias, bem como o índice de aborto/reabsorção fetal e infecção placentária em fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 (suscetível) e BALB/c (resistente).

3.2. Objetivos específicos

- Analisar o índice de aborto/reabsorção fetal em fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no início e terço final da gestação;
- Quantificar o parasitismo tecidual no útero/placenta, bem como no pulmão e sistema nervoso central (SNC) de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no início e terço final da gestação;
- Analisar o processo inflamatório no útero/placenta, bem como no pulmão e SNC de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no início e terço final da gestação;
- Verificar a presença de mastócitos totais, granulados e desgranulados no útero/placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no início e terço final da gestação;
- Avaliar os níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10, como também isotipos de imunoglobulinas específicas para *T. gondii* no soro de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com o parasito no início e terço final da gestação;

- Verificar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no útero/placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no início e terço final da gestação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

O presente estudo utilizou camundongos de 8 - 12 semanas de idade, das linhagens BALB/c e C57BL/6. Os animais foram adquiridos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e Universidade de Campinas (UNICAMP) e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada.

4.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo de número 054/08 (ANEXO I).

4.3. Acasalamento e detecção de prenhez

Fêmeas virgens (mínimo de 5 animais para cada grupo experimental) foram acasaladas com machos na proporção de duas fêmeas para cada macho. Todos os dias, pela manhã, as fêmeas foram observadas para verificar se havia presença da rolha vaginal (mistura de sêmen com secreção vaginal). O dia da detecção desse sinal foi considerado como o primeiro dia de gestação.

As fêmeas com presença da rolha vaginal foram separadas e infectadas com *T. gondii* distinguindo 3 grupos experimentais: 2 grupos de fêmeas foram infectados por via oral no 1º dia de gestação, sendo um grupo sacrificado aos 8 dias de gestação e infecção e o outro aos 19 dias de gestação e infecção e o 3º grupo de fêmeas foi infectado no 14º dia de gestação e sacrificado 5 dias após o inóculo do parasito.

Grupos controle foram avaliados sendo estes compostos por fêmeas não gestantes e não infectadas, bem como gestantes (com 8 e 19 dias de gestação) também não infectadas.

4.4. Organismos infecciosos

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em roedores *Calomys callosus*, os quais foram inoculados por via oral com 20 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro era removido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, estéril, pH 7.2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. O homogeneizado cerebral era novamente lavado por centrifugações a 1000 x g por 10 minutos em PBS. Os cistos cerebrais foram contados sob microscopia de luz utilizando uma objetiva de 10 x de aumento e utilizados para a infecção dos animais (BARBOSA et al., 2007).

4.5. Infecção experimental e resultados da gestação

Após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, considerado como primeiro dia de gestação, as fêmeas gestantes foram oralmente inoculadas com 5 cistos diluídos em 200 µl de PBS no 1º ou 14º dias de gestação. Os dois grupos de fêmeas infectadas no 1º dia de gestação foram sacrificados aos 8 e 19 dias após o inóculo e o grupo de fêmeas infectado no 14º dia de gestação foi sacrificado 5 dias após o inóculo do parasito. As fêmeas foram anestesiadas com Cetamine (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazine (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009) e o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital. Após a retração do coágulo, o soro foi segregado por centrifugação do sangue durante 5 minutos a 500 X g e preservado à -70 °C até o momento do uso. As fêmeas foram então sacrificadas por deslocamento cervical e os órgãos periféricos (pulmão, fígado, baço, coração), sistema nervoso central (SNC), bem como útero, placenta e fetos, foram coletados e preservados em diferentes fixadores de acordo com a finalidade experimental.

Quando o útero dos animais gestantes era removido, os mesmos foram documentados quanto aos sítios de implantação. A porcentagem de aborto foi calculada como a razão entre os sítios de reabsorção (ausência embrião/feto em animais onde se detectou a rolha vaginal anteriormente), pelo total de sítios de implantação (sítios de reabsorção mais sítios de implantação), como previamente descrito (JOACHIM et al., 2001; ZENCLUSSEN et al., 2002).

4.6. Análises morfológicas

O pulmão, cérebro, útero e placenta foram fixados em formol tamponado 10% ou Carnoy e processados para inclusão em parafina e cortes histológicos. Os cortes teciduais de 4 µm de espessura (40 µm de distância entre os cortes), obtidos dos tecidos incluídos em parafina, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análises histológicas e imunohistoquímica. Cortes histológicos de úteros e placentas fixados em Carnoy foram corados com Azul de Toluidina para contagem de mastócitos por microscopia de luz, que foi realizada em 35 campos microscópicos utilizando uma objetiva de 40 x de aumento. O índice de desgranulação dos mastócitos foi calculado como a média de mastócitos desgranulados (soma do número de mastócitos desgranulados dos animais do grupo, dividida pelo número total de animais do grupo) dividida pela média de mastócitos granulados (soma do número de mastócitos granulados dos animais do grupo, dividida pelo número total de animais do grupo). As análises foram feitas em 2 secções teciduais por animal e no mínimo utilizando-se 5 animais por grupo experimental.

4.7. Imunohistoquímica para detecção de parasitos

O parasitismo tecidual foi avaliado no pulmão, cérebro, útero e placenta por imunohistoquímica como previamente descrito (BENEVIDES et al., 2008). Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6.0, em forno microondas e os sítios não específicos foram bloqueados por incubação dos cortes com leite desnatado 3% (Molico – Nestlé). Feito isso, os cortes foram incubados durante a noite toda, com soro de *C. callosus* anti-*T. gondii* diluído em saponina 0,01% (1:100) e, posteriormente, com IgG de cabra anti camundongo biotilada (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). A reação foi amplificada usando o sistema ABC (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) e desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e estruturas como cisto presentes em 35 campos microscópicos no útero/placenta, 40 campos no pulmão e por secção tecidual no SNC. As análises foram feitas

utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em 2 secções teciduais por animal e no mínimo utilizando-se 5 animais por grupo experimental.

4.8. Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)

A produção de iNOS foi avaliada no útero aos 8 e 19 dias de infecção e gestação por meio de reações de imunohistoquímica. Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6.0, em forno microondas com posteriores lavagens em PBS e PBS-T 0,05%. Os sítios não específicos foram bloqueados por incubação dos cortes com leite desnatado 3% (Molico – Nestlé). Sequencialmente, os cortes foram incubados durante a noite toda, com o anticorpo primário produzido em coelho anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) diluído em PBS-saponina 0,01% (1:100) e, no dia seguinte, com anticorpo IgG de cabra anti coelho biotilado (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). A reação foi amplificada usando o sistema ABC – 1:100 (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) e desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) (PIERCE - 34002). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz.

4.9. Análises histológicas

Nas análises histológicas, foi avaliada a infiltração de leucócitos no útero e placenta, pulmão e cérebro. O escore inflamatório foi realizado no pulmão e SNC como previamente descrito por Silva e colaboradores (2009). Os infiltrados inflamatórios no pulmão foram graduados de acordo com a infiltração celular nos septos alveolares em 40 campos microscópicos do tecido pulmonar. Para obter o escore do infiltrado inflamatório no SNC, o número total de focos inflamatórios locais ou difusos foi quantificado em secções sagitais e na bainha dos vasos sanguíneos (manguito perivascular), bem como a infiltração de células inflamatórias nas meninges, que também foi analisada. Os escores inflamatórios no pulmão e SNC foram representados como unidades arbitrárias como sendo: 0 – 2, suave; 2 – 4, moderado; 4 – 6, grave; e acima de 6, muito grave. No útero, foi observada a infiltração de células inflamatórias e presença de necrose nos sítios de implantação. Todas as análises foram feitas em 2 cortes histológicos por animal, em pelo menos 5 animais por grupo, com a

objetiva de 40 x de aumento, em ensaio duplo cego. As alterações histológicas e o parasitismo tecidual foram concordantes entre os indivíduos de um mesmo grupo e entre os cortes dos mesmos órgãos para cada camundongo.

4.10. Detecção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii*

Para confirmar a soroconversão dos animais, foi realizado um imunoenensaio enzimático (ELISA) indireto para detectar a presença de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicas anti-*T. gondii*.

Para a detecção de IgG total específica, placas de microtitulação de poliestireno de baixa afinidade (Kartell SPA, Noviglio, Milão, Itália) foram sensibilizadas durante toda a noite com antígeno solúvel de *T. gondii* a 10 µg/ml em tampão carbonato 0,06 M, pH 9.6. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS mais Tween-20 0,05% (PBS-T) e incubadas com as amostras de soro de camundongo diluídas na proporção de 1:16 em PBS contendo leite desnatado 5% (PBS-TM) durante 1 hora à 37 °C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com IgG de cabra anti camundongo marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) diluída numa proporção 1:1000 em PBS-TM durante 1 hora à 37 °C. Após novas lavagens, a reação foi desenvolvida com o substrato enzimático que consiste em H₂O₂ 3% e 1 mg/ml de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão fosfato citrato 0,1 m, pH 5.0. A reação foi parada com H₂SO₄ 2 N e a densidade óptica (DO) foi mensurada a 492 nm, usando um leitor de placa (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Geneva, Switzerland).

4.11. Detecção de isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti-*T. gondii*

Para a detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti-*T. gondii*, placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar, New York, NY, USA) foram incubadas durante toda a noite a 4 °C com antígeno solúvel de *T. gondii* (10 µg/ml), lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-TM durante 1 hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com as amostras de soro de camundongo diluídas na proporção de 1:10 em PBS-TM e incubadas durante 2 horas a 37 °C. As subclasses de IgG foram detectadas com anticorpos secundários IgG1 de cabra anti camundongo ou IgG2a de cabra anti camundongo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) diluídos numa proporção de 1:250 em PBS-TM e incubados durante 2 horas a 37 °C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com IgG de coelho anti cabra marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.

St Louis, MO, EUA) diluído numa proporção de 1:10.000 em PBS-TM e incubadas durante 30 minutos a 37 °C. Após novas lavagens, a reação foi desenvolvida com 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolína ácido sulfônico (ABTS) 0,01 M (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) e H₂O₂ 3% e a DO foi determinada a 405 nm. Os resultados foram expressos pelo índice ELISA (IE) como se segue: IE = DO da amostra, onde o corte foi estabelecido como a média dos valores da DO dos soros do controle negativo mais 3 desvios padrão. Baseado em testes de rotina realizados com soros controles negativos e positivos, valores de IE > 1.0 foram considerados resultados positivos.

4.12. Detecção de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 nas amostras de soro

A detecção de citocinas foi realizada pelo teste ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante como se segue: IFN- γ (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), TNF e IL-10 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) e IL-6 (PeProtech Mexico, Veracruz, México). As concentrações das citocinas nas amostras de soro foram calculadas a partir de uma curva padrão de citocinas murinas recombinantes. O limite de detecção para cada ensaio foi de 31,3 pg/ml (IFN- γ), 15,6 (TNF), 31.3 pg/ml (IL-10) e 31,3 pg/ml (IL-6). Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio ficaram abaixo de 20% e 10%, respectivamente.

4.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) dos grupos experimentais. A comparação de dados entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c foi analisada pelo teste *t* de *Student*, enquanto que a comparação entre as diferentes condições experimentais foi analisada pelo teste ANOVA (one-way) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. A comparação do índice de aborto entre as linhagens foi analisada pelo teste exato de Fischer. A comparação das diferenças das citocinas entre as linhagens foi realizada pelo teste de Mann Whitney e as diferenças entre as condições experimentais de cada linhagem foram analisadas pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.14. Normas de Biossegurança

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

5. RESULTADOS

5.1. Índice de reabsorção fetal frente à infecção por *T. gondii*

Na nossa investigação experimental, primeiramente foi analisado o resultado da gestação em fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectadas com *T. gondii*. Foi observado que todas as fêmeas, tanto da linhagem C57BL/6 quanto BALB/c, aos 8 dias após a infecção, inoculadas no 1º dia de gestação, apresentaram sítios normais de implantação no útero e nenhum sítio de reabsorção (Tabela 1), porém, as fêmeas C57BL/6 apresentaram sítios de implantação com processos de necrose.

Nas fêmeas que foram inoculadas no 14º dia de gestação e analisadas 5 dias após o inóculo, observou-se que a infecção não interferiu no processo de gestação uma vez que aos 5 dias de infecção e 19 dias de gestação, embora sítios de reabsorção tenham sido observados, todas as fêmeas analisadas tiveram filhotes, independente da linhagem.

Quando fêmeas de camundongos BALB/c foram infectadas no 1º dia de gestação e avaliadas com 19 dias após a infecção, 50% das fêmeas apresentaram fetos, porém, entre as fêmeas da linhagem C57BL/6, nessa mesma condição, apenas 11% apresentaram sítios de implantação (Tabela 1). Esses dados sugerem que a infecção por *T. gondii* no início da gestação prejudica o resultado final da gestação em ambas as linhagens, sendo que as fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentaram um índice de aborto/reabsorção fetal quando comparados às fêmeas de camundongos BALB/c, que apresentaram índice de aborto igual a 50%.

Nos animais controle com 8 dias de gestação, não infectados, não ocorreram sítios reabsorvidos em ambas as linhagens, entretanto, nos animais controle de 19 dias de gestação, não infectados, é possível observar sítios de reabsorção que ocorrem naturalmente, numa proporção de 7 sítios reabsorvidos num total de 19 sítios de implantação entre as fêmeas da linhagem BALB/c e 6 sítios reabsorvidos num total de 17 sítios de implantação entre as fêmeas C57BL/6, o que corresponde à um índice natural de aborto de 37% e 35%, respectivamente.

Este resultado, embora não apresente diferença estatística significativa sugere que os efeitos da infecção são mais prejudiciais para as fêmeas de camundongos C57BL/6 e ainda, quando a infecção acontece no início da gestação.

Tabela 1. Presença de fetos no útero e índice de reabsorção fetal em fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas por via oral com cinco cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* no primeiro (início) e décimo quarto dias de gestação (terço final)

Linhagem	Grupos experimentais			
	8 dias de gestação	19 dias de gestação		
	8 dias de infecção	5 dias de infecção	19 dias de infecção	
BALB/c	Média de sítios normais ^a	7,5	5,1	2,2
	Média do total de sítios de implantação ^b	7,5	7	4,3
	Número de fêmeas com sítios de implantação/número de fêmeas com presença da rolha vaginal	6/(6)	6/(6)	3/(6)
	Média de sítios normais ^a	8,2	5,6	0,4
C57BL/6	Média do total de sítios de implantação ^b	8,2	7,6	0,9
	Número de fêmeas com sítios de implantação/número de fêmeas com presença da rolha vaginal	7/(7)	7/(7)	1/(9)

Após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, fêmeas consideradas gestantes foram oralmente inoculadas com cinco cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no primeiro (início) e décimo quarto dias (terço final) de gestação. Dois grupos de fêmeas foram infectadas no primeiro dia de gestação e destes, um grupo foi sacrificado aos 8 dias e o outro aos 19 dias após a infecção e um terceiro grupo de fêmeas foi infectado no décimo quarto dia de gestação e sacrificado cinco dias após a infecção. O número entre parênteses indica o número de fêmeas por grupo. ^aMédia de sítios normais calculada como a razão do total de sítios normais para cada grupo pelo número do total de fêmeas de cada grupo. ^bMédia do total de sítios de implantação foi calculada como a razão do total de sítios de implantação (sítios normais + sítios de reabsorção) para cada grupo pelo número do total de fêmeas de cada grupo. O índice de aborto entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c foi analisado pelo Teste exato de Fischer e as diferenças não foram estatisticamente significantes.

5.2. Parasitismo tecidual no pulmão, SNC, útero e placenta das fêmeas infectadas

O parasitismo tecidual foi investigado por imunohistoquímica no útero e placenta de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 8 e 19 dias de gestação e nos dias 5, 8 e 19 após infecção por *T. gondii*. A presença do parasito foi raramente observada com 5 e 8 dias após a infecção no útero/placenta em ambas as linhagens, no entanto, aos 19 dias de gestação e infecção o parasito foi detectado em 2 das 6 fêmeas BALB/c examinadas e em 1 das 9 fêmeas C57BL/6 examinadas (Figura 1A, B).

Como a detecção do parasito não foi freqüente no útero e placenta dos animais infectados, nós investigamos o parasitismo tecidual no pulmão e no cérebro, que são os principais sítios de proliferação do parasito (SILVA et al., 2009). O parasito foi raramente encontrado no pulmão com 5 dias de infecção e o parasitismo tecidual foi maior aos 8 dias de gestação e infecção para ambas as linhagens de camundongos. Além disso, as fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentaram alta carga parasitária no tecido pulmonar aos 8 dias de infecção/gestação comparadas com as fêmeas de camundongos BALB/c ($p < 0,05$) (Figura 1C). Aos 19 dias de gestação e infecção o parasito foi raramente detectado no tecido pulmonar de ambas as linhagens. Analisando a cinética da infecção no pulmão das fêmeas de camundongos C57BL/6, há um aumento significativo no parasitismo de 5 para 8 dias de infecção ($p < 0,05$) e uma diminuição significativa de 8 dias para 19 dias de infecção ($p < 0,05$), enquanto que nas fêmeas da linhagem BALB/c essas diferenças não são estatisticamente significantes (Figura 1C).

No cérebro, o parasito também foi raramente encontrado com 5 e 8 dias de infecção, entretanto, aos 19 dias de gestação e infecção foi observada alta carga parasitária nos camundongos C57BL/6 comparados aos BALB/c ($p < 0,05$) (Figura 1D).

Deste modo, o parasito foi detectado no pulmão e no cérebro de ambas as linhagens de camundongos, particularmente nas fêmeas de camundongos C57BL/6, que demonstraram ser mais suscetível do que as fêmeas de camundongos BALB/c.

Figura 1

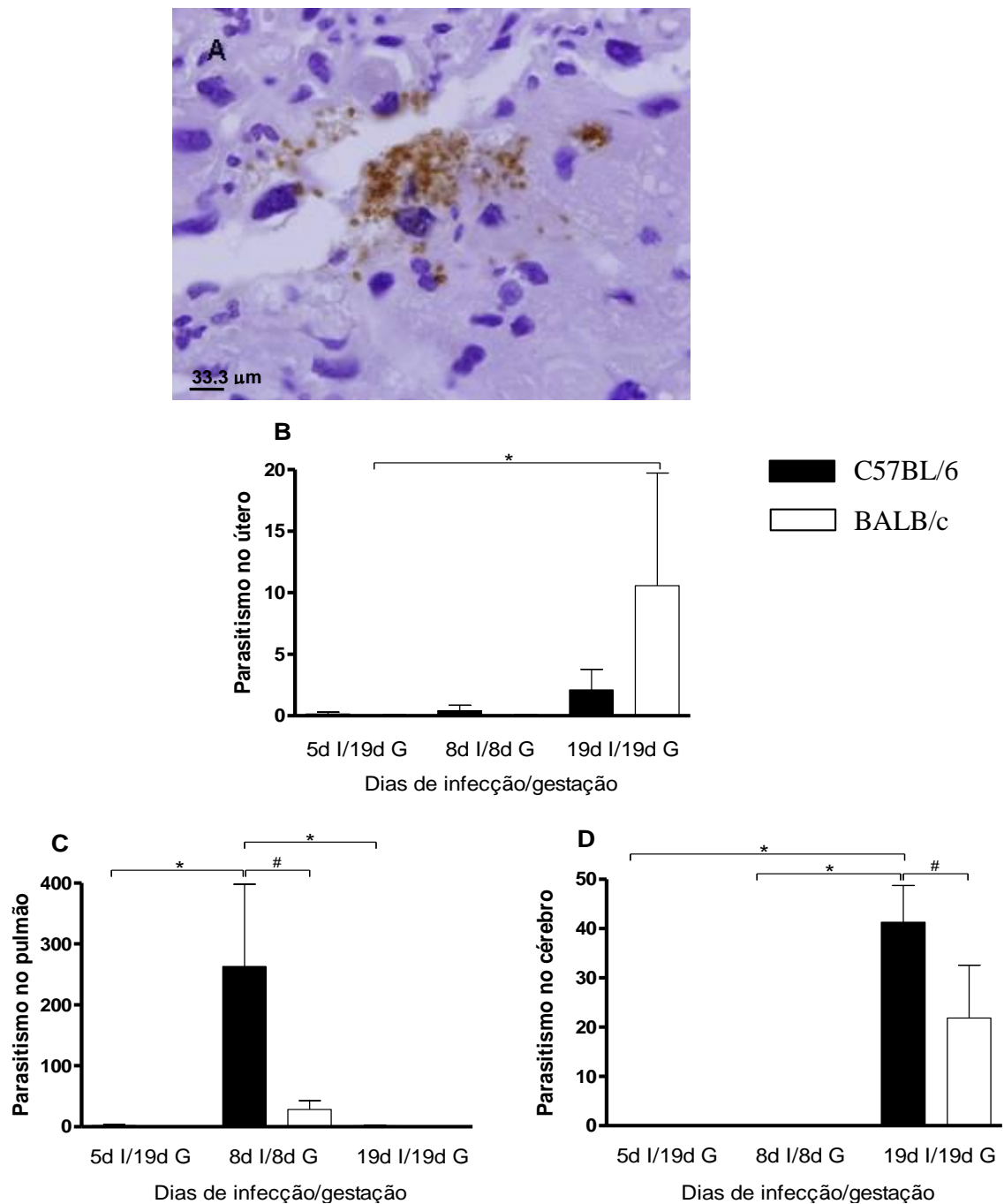


Figura 1: Fotomicrografia representativa dos parasitos detectados por imunohistoquímica na placenta de fêmeas de camundongos BALB/c aos 19 dias de gestação e infecção (A) e quantificação de parasitos no útero/placenta (B), pulmão (C) e cérebro (D) de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 5, 8 e 19 dias de infecção e 8 e 19 dias de gestação. Os dados foram obtidos em duas seções por camundongo no pulmão e por seção sagital no cérebro usando objetiva de 40 x. Cada grupo experimental foi constituído por 5 animais. #Significância estatística entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 (Teste *t* de Student, $p < 0,05$); *Significância estatística de cada linhagem nas diferentes condições experimentais (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$). Dias de infecção (d I); Dias de gestação (d G).

5.3. Análise histológica do útero/placenta, pulmão e cérebro de fêmeas de camundongos infectadas com *T. gondii*

Para verificar se o prejuízo gestacional nos camundongos C57BL/6 estava relacionado com a maior infiltração de células inflamatórias no útero e placenta, foram realizadas análises histológicas aos 8 dias de gestação e infecção, pois, é sabido que esta linhagem de camundongo desenvolve uma reação inflamatória elevada em infecções por *T. gondii*. O 8º dia de gestação e infecção foi analisado devido ao fato de que aos 19 dias após a detecção da rolha vaginal e infecção, apenas 1 fêmea de camundongo C57BL/6 apresentou sítios de implantação e aos 19 dias de gestação e 5 dias de infecção nenhuma alteração significativa foi observada.

Comparando as fêmeas de camundongos BALB/c não infectadas com as infectadas, foi possível observar que a migração de leucócitos para o útero/placenta parece ser similar para ambas as condições (Figuras 2A, B). Ao contrário, as fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentaram maior migração de leucócitos no útero e sítio de implantação aos 8 dias de gestação e infecção quando comparadas às fêmeas de camundongos BALB/c nas mesmas condições (Figuras 2B, D). Em alguns animais o recrutamento de células inflamatórias foi também observado na musculatura lisa da parede do útero de fêmeas de camundongos C57BL/6 gestantes (Figura 2D). Ainda nas fêmeas C57BL/6, além dos sítios de implantação com aparência normal (Figura 2E), foi possível observar processos de necrose em alguns sítios aos 8 dias de gestação e infecção (Figura 2F), enquanto que essa alteração não foi verificada em nenhum dos sítios de implantação das fêmeas de camundongos BALB/c gestantes e infectadas. De 8 fêmeas BALB/c analisadas aos 8 dias de infecção e gestação, nenhuma apresentou focos de necrose no útero/placenta e 3 apresentaram pequenos focos inflamatórios. Já entre as 8 fêmeas C57BL/6 analisadas aos 8 dias de infecção e gestação, 3 apresentaram focos de necrose no útero/placenta e 4 apresentaram pequenos focos inflamatórios.

Além disso, as alterações inflamatórias foram comparativamente analisadas no pulmão e SNC das fêmeas de ambas as linhagens de camundongos infectadas e gestantes. O pulmão das fêmeas BALB/c e C57BL/6 apresentaram alterações inflamatórias aos 5 dias após a infecção (Figura 3A) e, com a progressão da infecção, as lesões foram crescentes para ambas as linhagens de camundongos. As lesões pulmonares observadas nas fêmeas de camundongos após infecção com *T. gondii* se caracterizaram pela presença de infiltrados inflamatórios nos

septos alveolares, constituídos por células mononucleadas. Foi observada lesão inflamatória mais grave aos 8 dias de gestação e infecção nas fêmeas da linhagem C57BL/6 comparadas às fêmeas da linhagem BALB/c ($p = 0,0153$) (Figura 3A) e as lesões foram, também, significativamente maiores no pulmão das fêmeas C57BL/6 aos 19 dias de gestação e infecção comparadas às fêmeas BALB/c ($p < 0,001$) (Figura 3A). Durante o curso da infecção, no pulmão das fêmeas C57BL/6 ocorrem diferenças significantes quanto ao infiltrado leucocitário entre os diferentes dias de infecção/gestação (Figura 3B), enquanto que essas diferenças são menos significantes nas fêmeas BALB/c (Figura 3C).

No SNC, a reação inflamatória aos 5 e 8 dias após a infecção em ambas as linhagens de camundongos foi analisada e apresentou lesões leves, sem alterações inflamatórias relevantes, nestes tempos de infecção, porém, aos 19 dias de gestação e infecção por *T. gondii*, as lesões foram significativamente maiores no SNC das fêmeas C57BL/6 comparadas às fêmeas de camundongos BALB/c ($p = 0,007$) (Figura 4A). As lesões foram caracterizadas por infiltrados de células mononucleadas, nódulos gliais, manguito perivascular e infiltrados inflamatórios focais nas meninges de alguns animais. Infiltrados inflamatórios difusos também foram verificados e quantificados. Durante o curso da infecção, no SNC das fêmeas C57BL/6 ocorrem diferenças significantes quanto ao infiltrado leucocitário entre os diferentes dias de infecção/gestação (Figura 4B), enquanto que essas diferenças são menos significantes nas fêmeas BALB/c (Figura 4C).

Figura 2

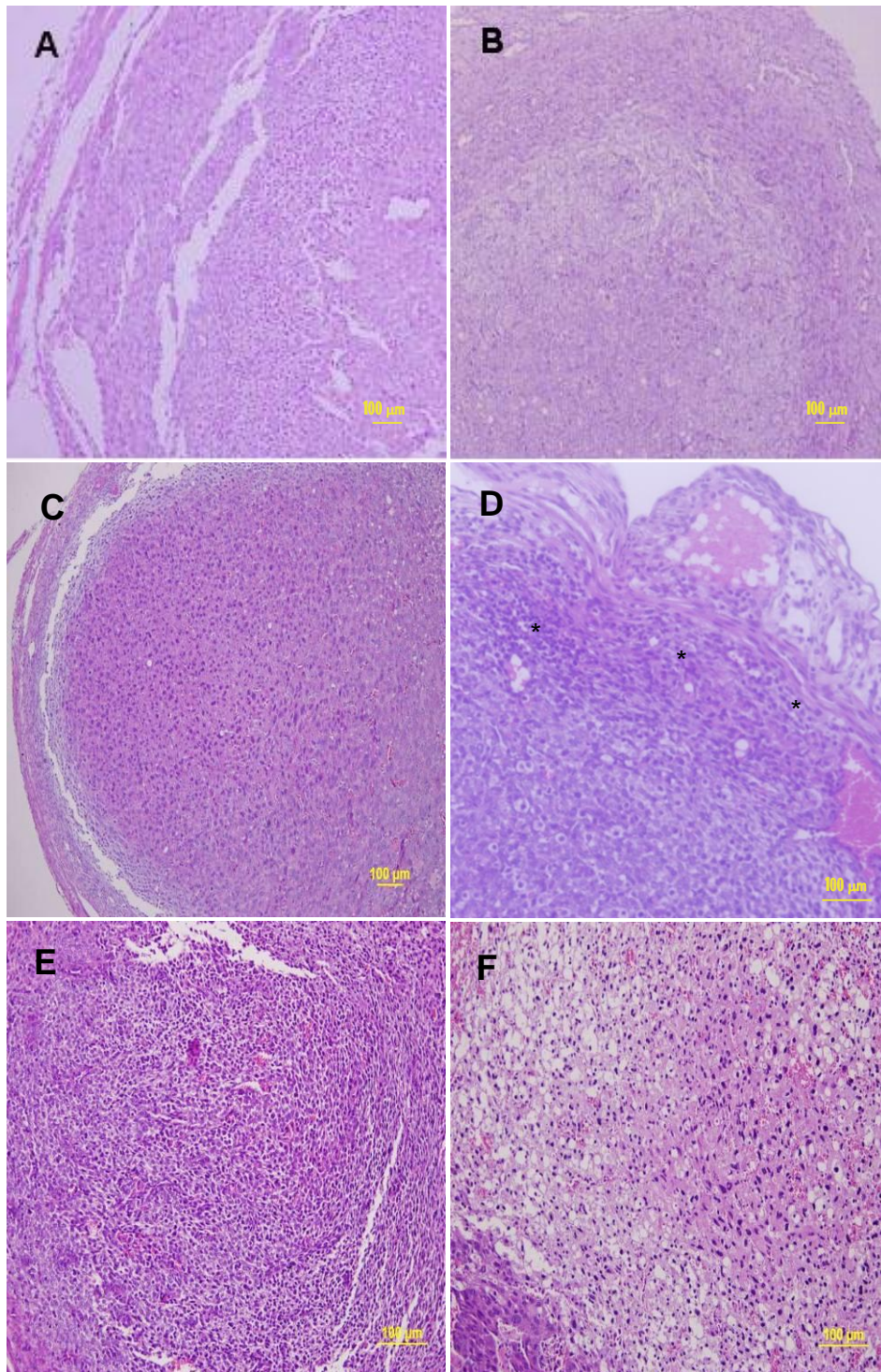


Figura 2: Fotomicrografias representativas do útero de fêmeas de camundongos BALB/c aos 8 dias de gestação, não infectadas (A) e aos 8 dias de gestação e infecção com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral (B) e fêmeas C57BL/6 nas mesmas condições (C e D). Os asteriscos indicam infiltrados de leucócitos na musculatura lisa da parede do útero. Fotomicrografias representativas dos sítios de implantação de uma fêmea C57BL/6 aos 8 dias de infecção e gestação mostrando um sítio de implantação normal (E) e um sítio de implantação em processo de necrose (F). A coloração utilizada foi HE.

Figura 3

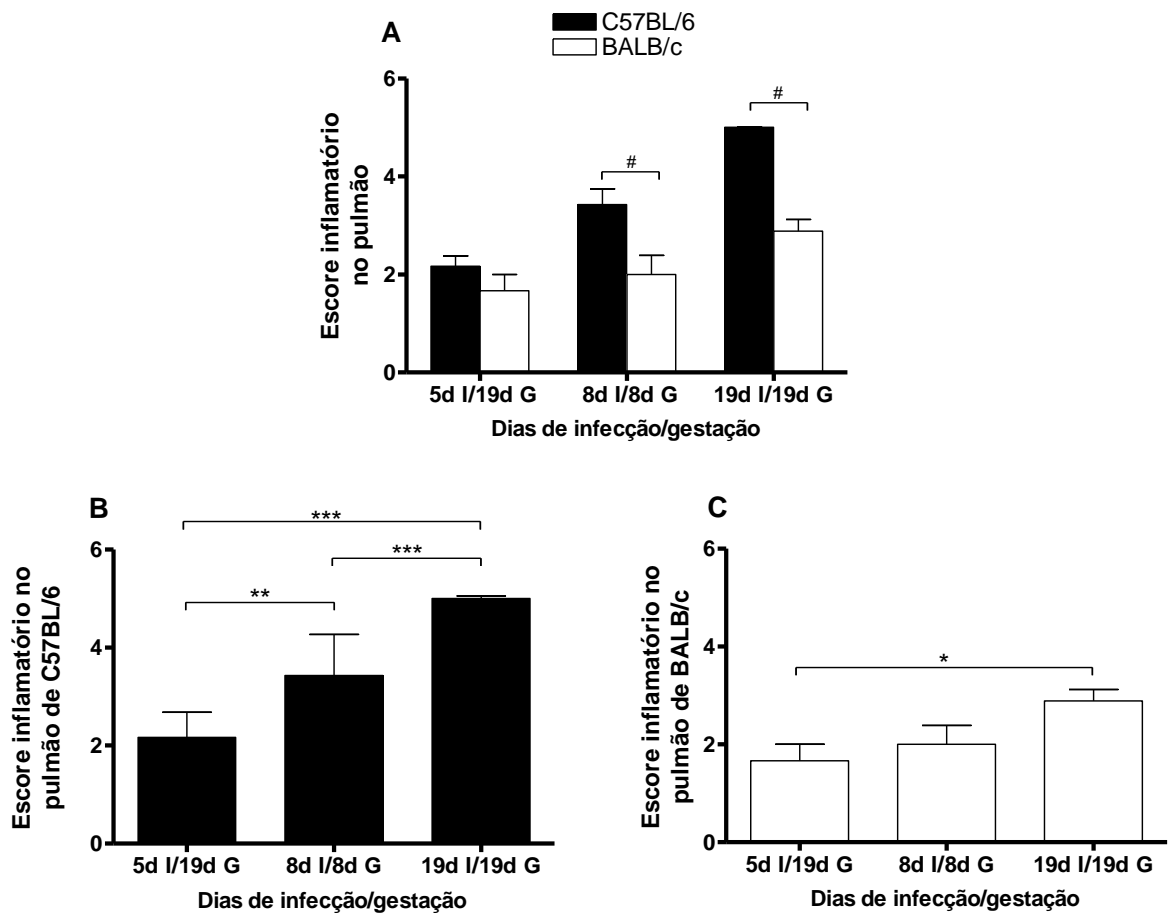


Figura 3: Escore inflamatório no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c, comparativamente (A) e no pulmão de camundongos C57BL/6 (B) e BALB/c (C) separadamente aos 5, 8 e 19 dias de infecção com 5 cistos de *T. gondii* e 8 e 19 dias de gestação. Dias de infecção (d I); Dias de gestação (d G). O escore inflamatório foi avaliado em lâminas coradas por HE e avaliadas conforme descrito na seção de material e métodos. #Significância estatística entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 (Teste *t* de Student, $p < 0,05$); *Significância estatística de cada linhagem nas diferentes condições experimentais (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $*p < 0,05$; $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$).

Figura 4

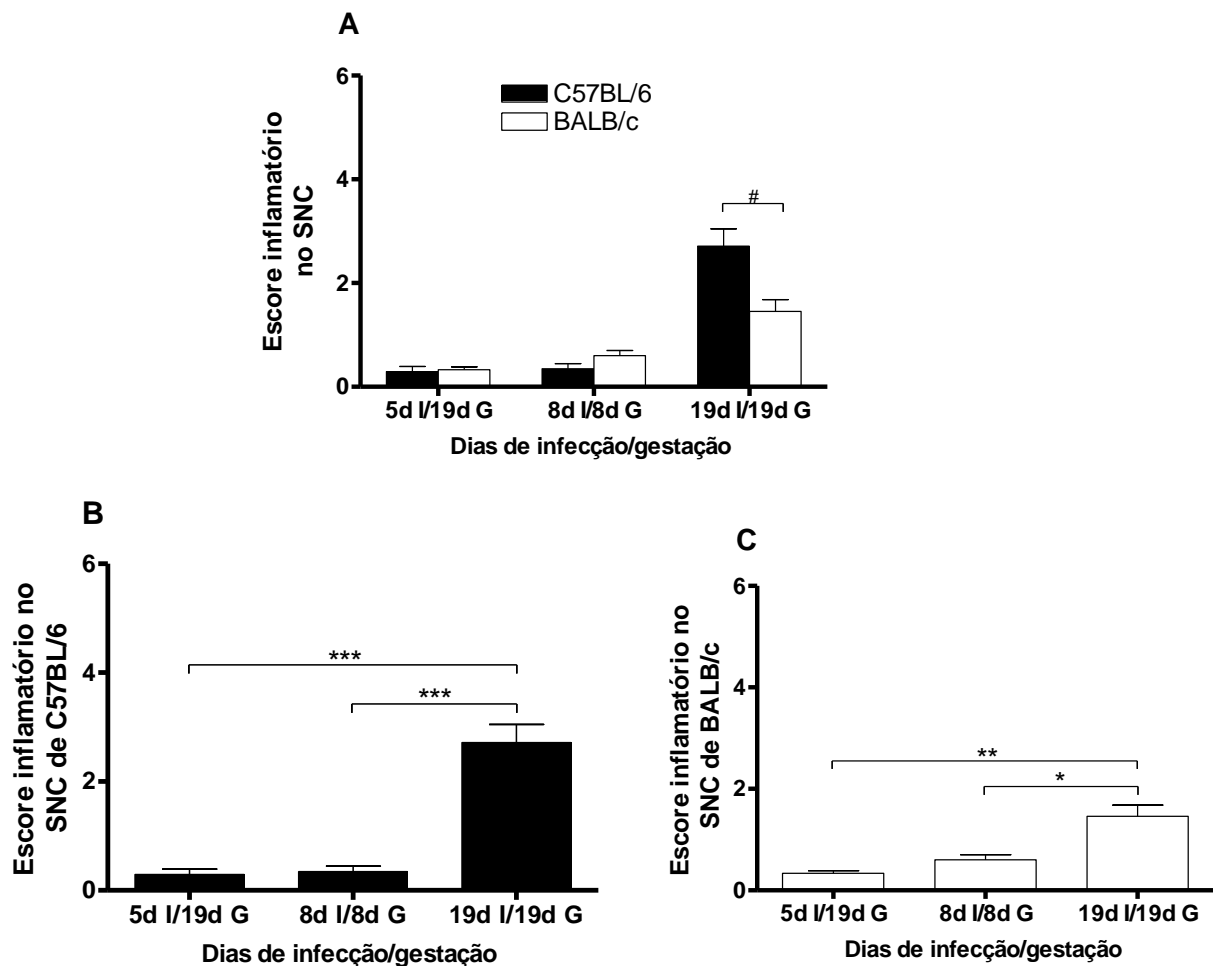


Figura 4: Escore inflamatório no SNC das fêmeas das linhagens C57BL/6 e BALB/c, comparativamente (A) e no SNC de fêmeas C57BL/6 (B) e BALB/c (C) aos 5, 8 e 19 dias de infecção com *T. gondii* e 8 e 19 dias de gestação. O escore inflamatório foi analisado no SNC das fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c que foram infectadas no primeiro e décimo quarto dias de gestação. Dias de infecção (d I); Dias de gestação (d G). #Significância estatística entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c (Teste *t* de Student, $p < 0,05$); *Significância estatística de cada linhagem nas diferentes condições experimentais (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $*p < 0,05$; $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$).

5.4. Detecção de iNOS no útero/placenta de fêmeas de camundongos infectadas ou não com *T. gondii*

Como foram verificados prejuízos gestacionais mais graves e maior migração de leucócitos no útero das fêmeas de camundongos C57BL/6 aos 8 dias de gestação e infecção, a expressão de iNOS foi avaliada no útero/placenta das fêmeas infectadas ou não com *T. gondii* e gestantes ou não. O objetivo foi verificar se o índice de aborto estaria relacionado com a expressão desta enzima. As fêmeas não gestantes e não infectadas não apresentaram a expressão da enzima no útero. As fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção apresentaram a expressão da enzima no útero na região do sítio de implantação (Figura 5A, B), não sendo observada diferença na expressão entre ambas as linhagens.

Fêmeas aos 8 dias de gestação e não infectadas também apresentaram a expressão da enzima no útero na região do sítio de implantação (Figura 5C, D), entretanto, não se observou um aumento em relação às fêmeas não infectadas e também não se observou diferença de expressão entre as linhagens nas mesmas condições experimentais. A expressão foi também verificada na placenta de fêmeas não infectadas aos 19 dias de gestação (dados não apresentados).

Esses resultados sugerem que o maior prejuízo gestacional observado nas fêmeas de camundongos C57BL/6 infectadas por *T. gondii*, está relacionado ao maior processo inflamatório e necrose dos sítios de implantação desenvolvido nas fêmeas desta linhagem, quando comparadas às fêmeas de camundongos BALB/c e não à expressão de iNOS.

Figura 5

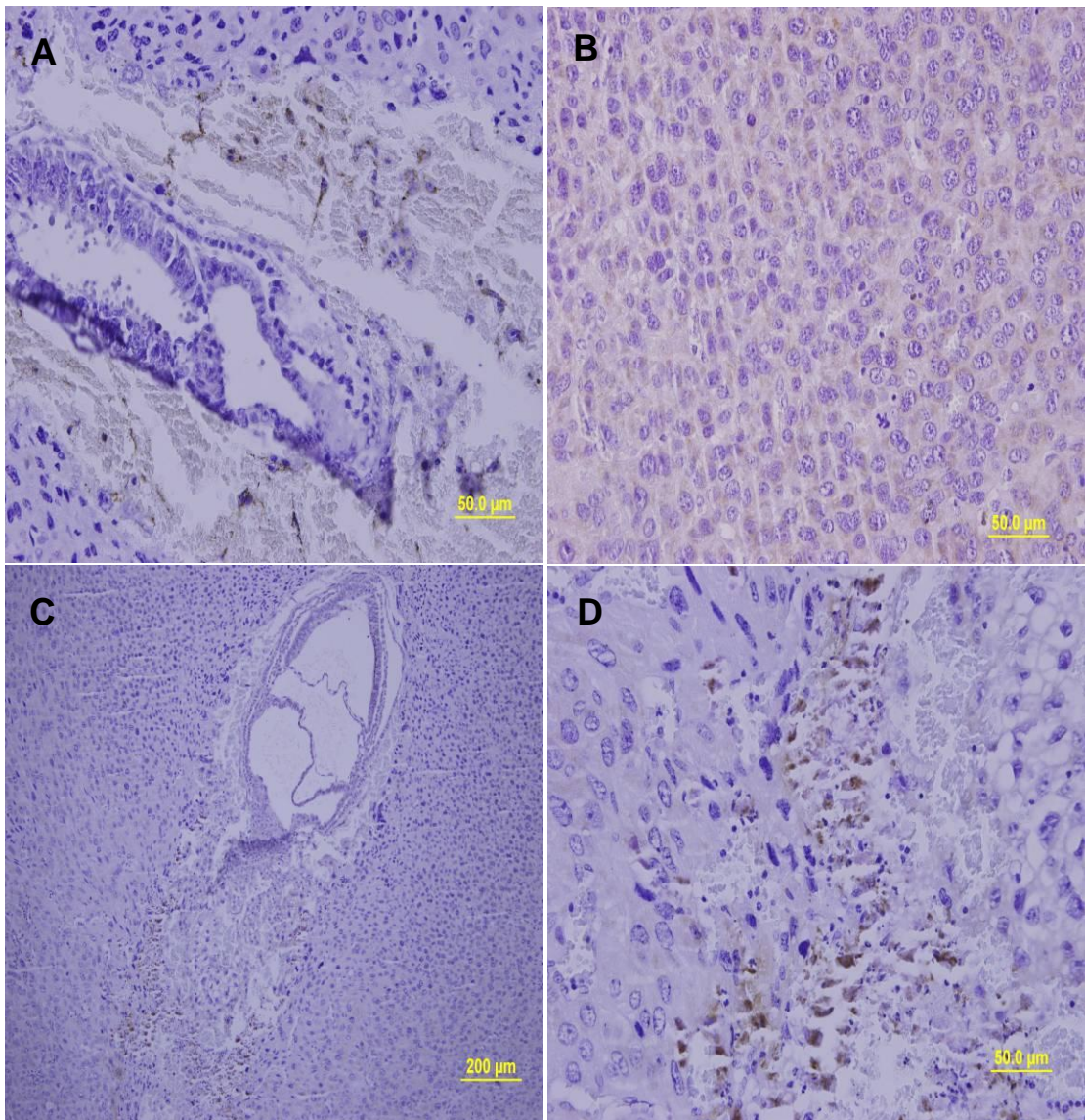


Figura 5: Fotomicrografia representativa da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) detectada por imunohistoquímica no útero de fêmeas de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) aos 8 dias de gestação e infecção por *T. gondii* e útero de camundongo BALB/c aos 8 dias de gestação e não infectada em menor aumento (C) e em maior aumento (D).

5.5. Presença de mastócitos totais, granulados e desgranulados no útero/placenta

Como foram observados prejuízos gestacionais mais graves e maior migração de leucócitos no útero das fêmeas de camundongos C57BL/6 aos 8 dias de gestação e infecção, nós analisamos a infiltração de mastócitos no útero e placenta dos animais experimentais. Além disso, a desgranulação dos mastócitos está relacionada com o processo de angiogênese durante a gestação, sendo assim, a desgranulação dos mastócitos neste ambiente também foi analisada.

Aos 8 dias de gestação, nas fêmeas não infectadas, foi observada a presença de mastócitos desgranulados em ambas as linhagens (Figuras 6A, B). As fêmeas C57BL/6 infectadas apresentaram maior infiltração de mastócitos no útero em todas as condições experimentais, quando comparadas às fêmeas BALB/c, exceto aos 5 dias de infecção, uma vez que a quantidade de mastócitos foi similar para ambas as linhagens (Figuras 7A, B, C). Aos 19 dias de gestação e infecção, foi observado maior número de mastócitos totais no útero destes animais em relação às fêmeas de camundongos BALB/c ($p = 0,0061$) (Figuras 6C, D e 7A), considerando as fêmeas gestantes e as que sofreram reabsorção fetal.

Quanto à desgranulação dos mastócitos, foi observado que com 5 dias de infecção, o número de mastócitos granulados e desgranulados no útero foi similar em ambas as linhagens, entretanto, aos 8 dias de gestação o número de mastócitos granulados foi aparentemente maior nas fêmeas da linhagem C57BL/6 comparadas com as fêmeas da linhagem BALB/c, enquanto que aos 19 dias de gestação e infecção o número de mastócitos granulados foi estatisticamente maior nas fêmeas C57BL/6 em comparação com as fêmeas BALB/c ($p = 0,0322$) (Figura 7B).

Quanto aos mastócitos desgranulados, aos 5 dias de infecção a quantidade é similar entre as linhagens, já aos 8 dias de infecção o número de mastócitos desgranulados é estatisticamente maior nas fêmeas da linhagem C57BL/6 em comparação com as fêmeas da linhagem BALB/c ($p = 0,0014$), enquanto que aos 19 dias de infecção, o número de mastócitos desgranulados parece ser maior nas fêmeas C57BL/6, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa (Figura 7C). Aos 8 dias de gestação e infecção os animais C57BL/6 apresentaram um índice de desgranulação igual a 1,15 enquanto para os animais BALB/c este índice foi igual a 2,2. Entretanto, aos 19 dias de gestação e infecção o índice de desgranulação foi maior nas fêmeas C57BL/6 (0,6) comparado com as fêmeas BALB/c (0,27). Esses dados mostram que o índice de desgranulação é maior entre as linhagens aos 8 dias de gestação e infecção em relação aos 19 dias de gestação e infecção.

Analisando a cinética da infecção na linhagem C57BL/6, quanto ao número de mastócitos totais, a diferença é estatisticamente significativa para o grupo de fêmeas aos 19 dias de infecção e gestação comparadas com o grupo de fêmeas aos 19 dias de gestação e não infectadas ($p < 0,001$), enquanto que nas fêmeas da linhagem BALB/c essa diferença não é estatisticamente significativa (Figura 7A). Além disso, durante o curso da infecção nas fêmeas da linhagem C57BL/6, quanto aos mastócitos desgranulados, observa-se que existe diferença estatisticamente significativa para o grupo de fêmeas aos 19 dias de infecção e gestação comparadas com o grupo controle aos 19 dias de gestação e não infectadas (Figura 7D).

Embora não apresente diferença estatística significativa, nas fêmeas BALB/c foi observado que a infecção pelo parasito também prejudica a desgranulação dos mastócitos aos 19 dias de gestação e infecção (Figura 7E).

Esses resultados sugerem que a infecção por *T. gondii* afeta o processo de desgranulação dos mastócitos em ambas as linhagens de camundongos, mas os efeitos do parasito, nesse mecanismo, são mais evidentes nas fêmeas de camundongos C57BL/6.

Figura 6

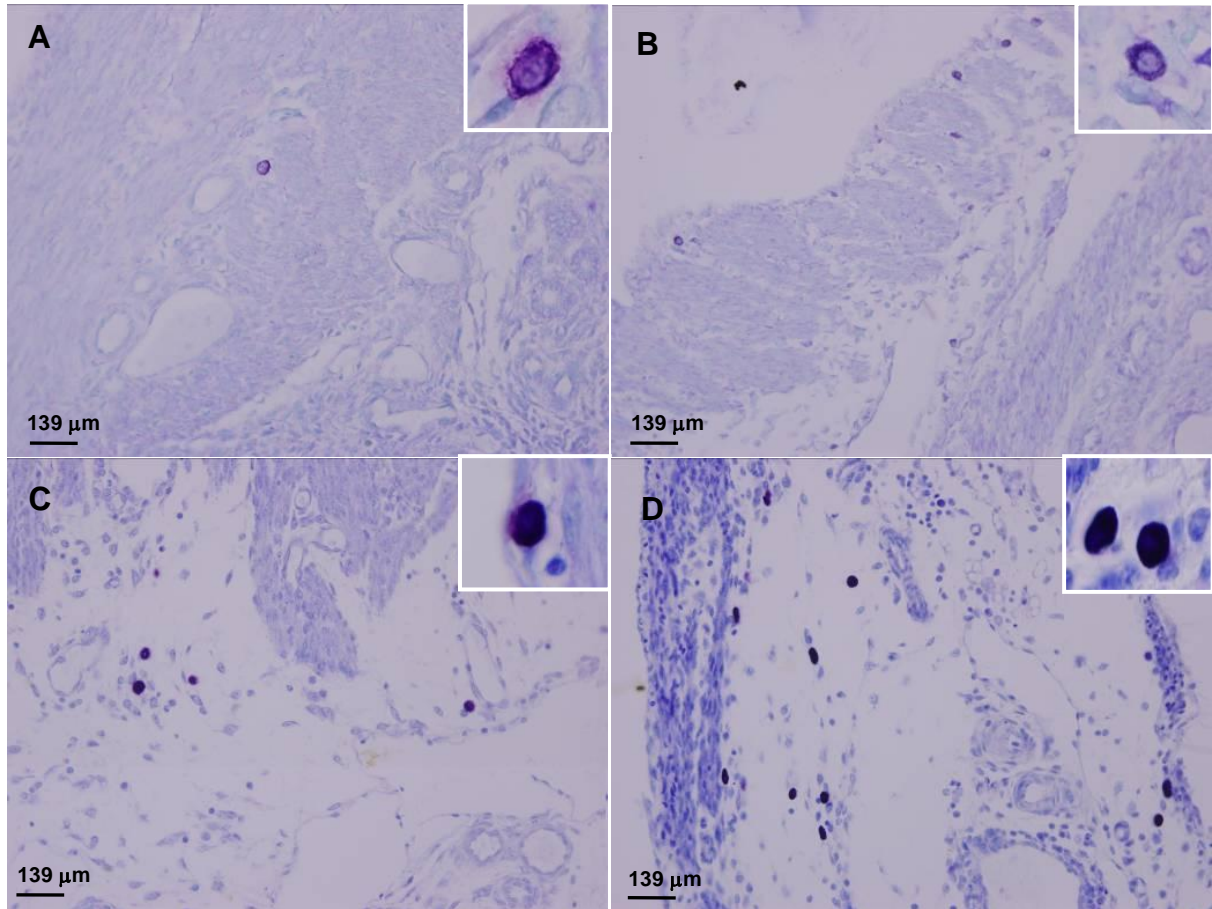


Figura 6: Fotomicrografias representativas do útero de fêmeas de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) aos 8 dias de gestação e não infectadas mostrando a presença de mastócitos desgranulados; e placenta de camundongos BALB/c (C) e C57BL/6 (D) aos 19 dias de gestação e infecção por via oral com 5 cistos de *T. gondii* mostrando a presença de mastócitos granulados. Coloração por Azul de Toluidina.

Figura 7

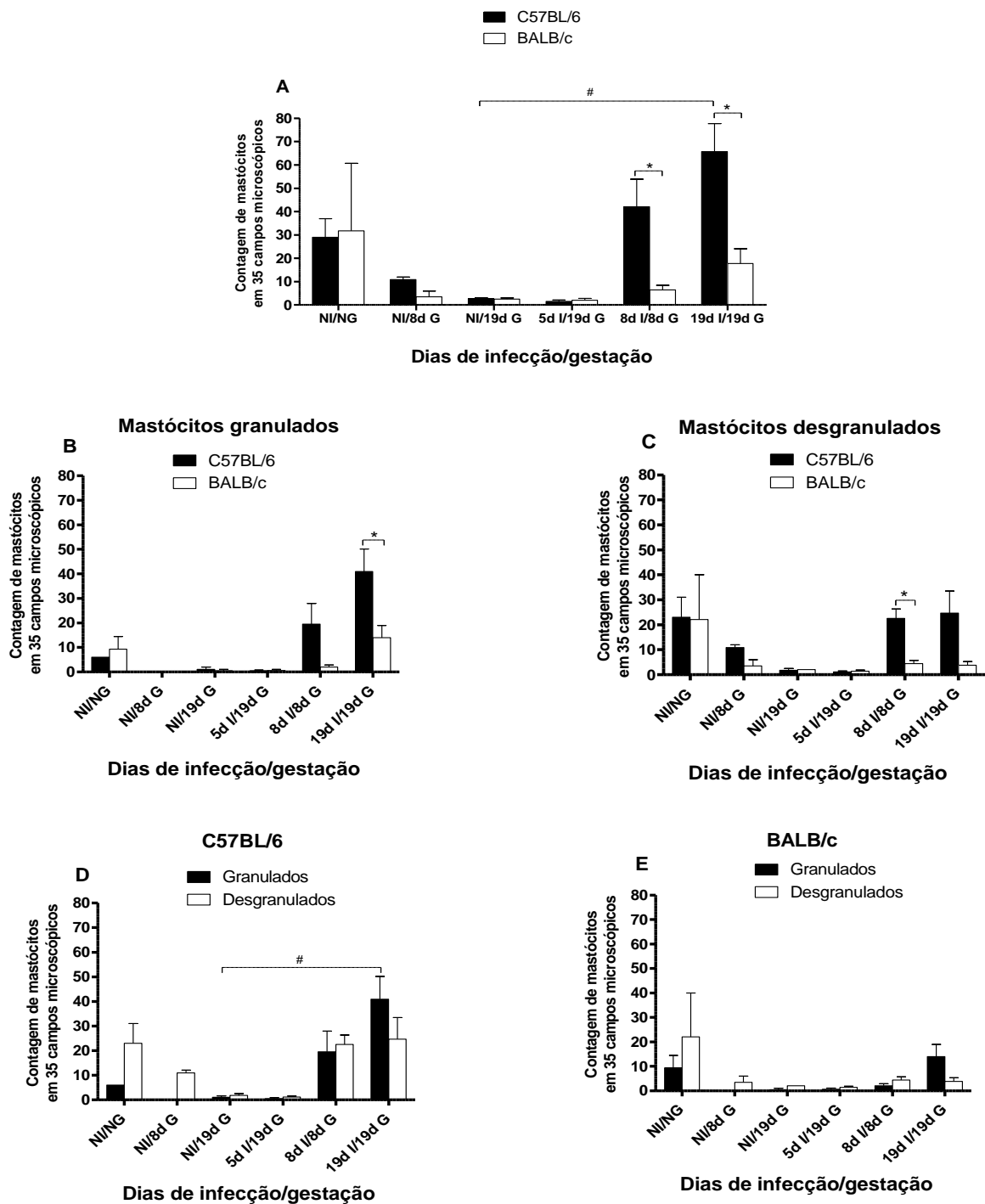


Figura 7: Contagem de mastócitos totais (A), granulados (B) e desgranulados (C) nos camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 5, 8 e 19 dias de infecção com *T. gondii* e 8 e 19 dias de gestação. Contagem de mastócitos granulados e desgranulados na linhagem C57BL/6 (D) e BALB/c (E) separadamente. #Significância estatística de cada linhagem nas diferentes condições experimentais (Testes ANOVA e Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$); *Significância estatística entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 (Teste *t* de Student, $p < 0,05$). Dias de infecção (d I), Dias de gestação (d G); Não infectadas (NI); Não gestantes (NG).

5.6. Níveis de citocinas no soro dos animais nas diferentes condições experimentais

A infecção por *T. gondii* provoca uma série de desordens imunológicas. Para determinar se a infecção pelo parasito pode causar alterações no balanço dos perfis de resposta Th1/Th2 nas fêmeas de camundongos gestantes, os níveis de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 foram mensurados no soro de fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 não gestantes e não infectadas; aos 8 e 19 dias de gestação e não infectadas e com 5, 8 e 19 dias de infecção que correspondem à 19, 8 e 19 dias de gestação, respectivamente.

Fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram um aumento na produção de IFN- γ aos 5 e 8 dias de gestação e infecção com relação a todas as outras condições experimentais e controles (Figura 8A) e este aumento foi aparentemente maior nas fêmeas da linhagem C57BL/6. Nas fêmeas não gestantes e não infectadas, bem como fêmeas aos 8 e 19 dias de gestação e não infectadas, a produção de IFN- γ apresenta-se similar em ambas as linhagens (Figura 8A). Ainda quanto a citocina IFN- γ , na linhagem BALB/c a produção desta citocina foi significativamente maior nas fêmeas aos 8 dias de infecção e gestação quando comparadas aos controles não gestantes e não infectadas ($p < 0,01$), bem como as fêmeas não gestantes e não infectadas comparadas às fêmeas aos 5 dias de infecção e 19 dias de gestação ($p < 0,05$) (Figura 8A). Observou-se também níveis aparentemente mais elevados de IFN- γ nas fêmeas BALB/c aos 8 dias de infecção e gestação comparadas às fêmeas aos 19 dias de infecção e gestação. Para as fêmeas da linhagem C57BL/6, estas diferenças também ocorrem, porém, a produção de IFN- γ foi significativamente maior para as fêmeas aos 8 dias de infecção e gestação comparadas aos controles não gestantes e não infectadas ($p < 0,01$), bem como maior para as fêmeas aos 8 dias de gestação e infecção comparadas às fêmeas aos 8 dias de gestação e não infectadas ($p < 0,05$) e ainda, maior nas fêmeas aos 8 dias de infecção e gestação comparadas às fêmeas aos 19 dias de infecção e gestação ($p < 0,05$) (Figura 8A).

Aos 8 dias de gestação e infecção a produção de TNF foi significativamente maior nas fêmeas da linhagem C57BL/6 ($p = 0,0317$), bem como aos 19 dias de gestação e infecção ($p = 0,0140$) comparadas às fêmeas BALB/c. Aos 5 dias de infecção e gestação, embora não seja estatisticamente significante, as fêmeas C57BL/6 apresentam um aumento aparente na produção de TNF quando comparadas às fêmeas BALB/c (Figura 8B).

Nas fêmeas da linhagem BALB/c a produção de TNF é significativamente maior aos 19 dias de infecção e gestação comparados às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p < 0,01$). Nas fêmeas da linhagem C57BL/6 a produção de TNF é significativamente maior nas fêmeas aos 8 dias de infecção e gestação comparadas às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p <$

0,001) e controle aos 8 dias de gestação e não infectadas ($p < 0,05$) (Figura 8B). Ainda, a produção de TNF, embora não seja estatisticamente significativa, apresenta-se relativamente maior nas fêmeas C57BL/6 aos 8 dias de infecção e gestação quando comparadas às fêmeas com 19 dias de infecção e gestação.

Em relação a IL-6, aos 5 dias de infecção e gestação, houve uma elevada produção de IL-6 e esta foi aparentemente maior nas fêmeas da linhagem BALB/c. Já aos 8 dias de infecção e gestação, a produção de IL-6 foi similar para ambas as linhagens (Figura 8C). Aos 19 dias de infecção e gestação, a produção de IL-6 diminuiu com relação ao 8º dia de infecção e as fêmeas C57BL/6 aos 8 dias de infecção e gestação apresentam aumento significativo na produção de IL-6 quando comparadas as fêmeas não gestantes e não infectadas ($p < 0,05$) (Figura 8C). Nas fêmeas da linhagem BALB/c há aumento significativo da produção de IL-6 aos 5 dias de infecção e gestação comparadas às fêmeas não gestantes e não infectadas ($p < 0,05$) (Figura 8C).

Os níveis de IL-10, embora não sejam estatisticamente significantes, apresentaram tendência de serem maiores nas fêmeas C57BL/6 aos 5 e 8 dias de infecção por *T. gondii* (Figura 8D). Aos 19 dias de gestação e infecção, a produção de IL-10 se torna aparentemente maior nas fêmeas da linhagem BALB/c, enquanto que as fêmeas com 19 dias de gestação e não infectadas apresentam níveis de IL-10 aparentemente similares entre ambas as linhagens (Figura 8D).

De modo geral, o prejuízo gestacional que ocorre nas fêmeas de camundongos BALB/c, em menor proporção, e C57BL/6, em maior proporção, infectadas com *T. gondii* pode estar associado à maior produção de citocinas pró-inflamatórias nos animais C57BL/6 especialmente aos 8 dias de gestação e infecção, período que deveria exibir um perfil Th2 e, no entanto exibe um perfil Th1, o qual normalmente é desenvolvido frente a infecção por *T. gondii*.

Figura 8

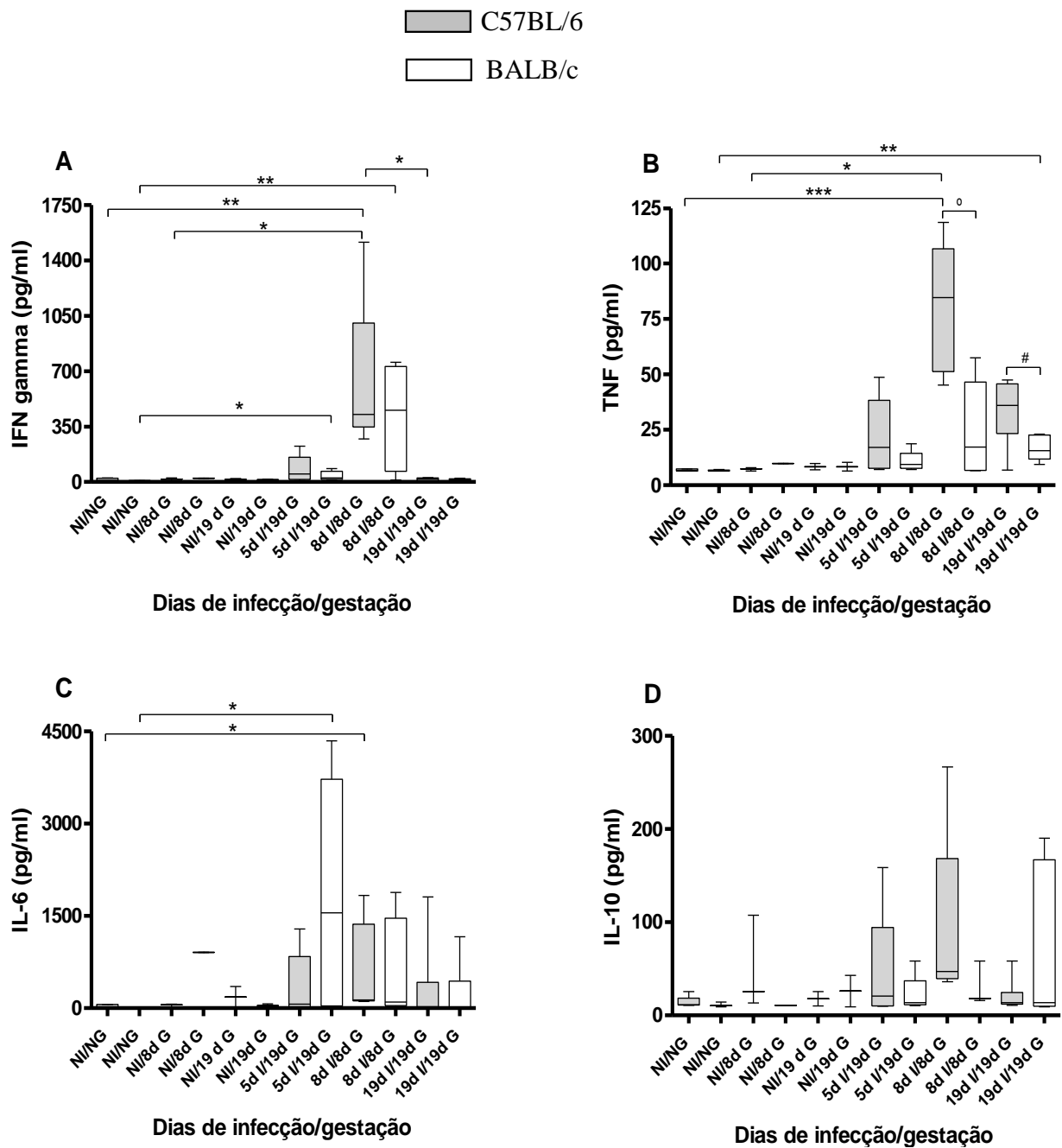


Figura 8: Níveis de citocinas nas amostras de soro dos camundongos C57BL/6 e BALB/c não gestantes e não infectados; gestantes e não infectados e aos 5, 8 e 19 dias de infecção por via oral com 5 cistos de *T. gondii*. Os níveis de IFN- γ (A), TNF (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram mensurados pelo imunoenensaio enzimático (ELISA) sanduíche e os dados foram representados como mediana. ^oSignificância estatística entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 (Mann Whitney, $p < 0,05$); ^o $p = 0,0317$; [#] $p = 0,0140$. *Significância estatística entre as condições experimentais em cada linhagem (Kruskal Wallis, $p < 0,05$), $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. Dias de infecção (d I), Dias de gestação (d G); Não infectadas (NI); Não gestantes (NG).

5.7. Resposta imune humoral

A produção de IgG e dos isotipos de imunoglobulina, IgG1 e IgG2a, foi verificada em fêmeas de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c gestantes ou não e infectadas ou não com *T. gondii*. Aos 5 ou 8 dias de infecção não foi detectada a presença de níveis de IgG total no soro das fêmeas. A detecção de IgG total foi observada aos 19 dias de gestação e infecção em ambas as linhagens (Figura 9A). Observou-se níveis mais elevados de IgG total no soro das fêmeas de camundongos BALB/c em relação às fêmeas de camundongos C57BL/6.

Anticorpos IgG1 específicos para *T. gondii* (perfil Th2) e IgG2a (perfil Th1) foram detectados nas fêmeas com 19 dias de gestação e infecção e, de acordo com a resposta de perfil Th1 que normalmente é desenvolvida na infecção por *T. gondii*, os níveis de IgG2a (Figura 9B) foram maiores do que IgG1 (Figura 9C) em ambas as linhagens de camundongos. Além disso, os níveis de IgG2a e IgG1 no soro dos animais foram maiores nas fêmeas de camundongos BALB/c comparadas às fêmeas de camundongos C57BL/6 (Figura 9B, C).

De modo geral, as fêmeas da linhagem BALB/c produzem maiores quantidades de imunoglobulinas específicas anti-*T. gondii* quando comparadas às fêmeas da linhagem C57BL/6 (Figura 9A, B, C). Sabendo que as imunoglobulinas conferem proteção por meio da ativação do complemento e prevenção da infecção de novas células do hospedeiro, a maior produção observada nas fêmeas BALB/c pode contribuir para os melhores resultados gestacionais desta linhagem em relação às fêmeas da linhagem C57BL/6.

Figura 9

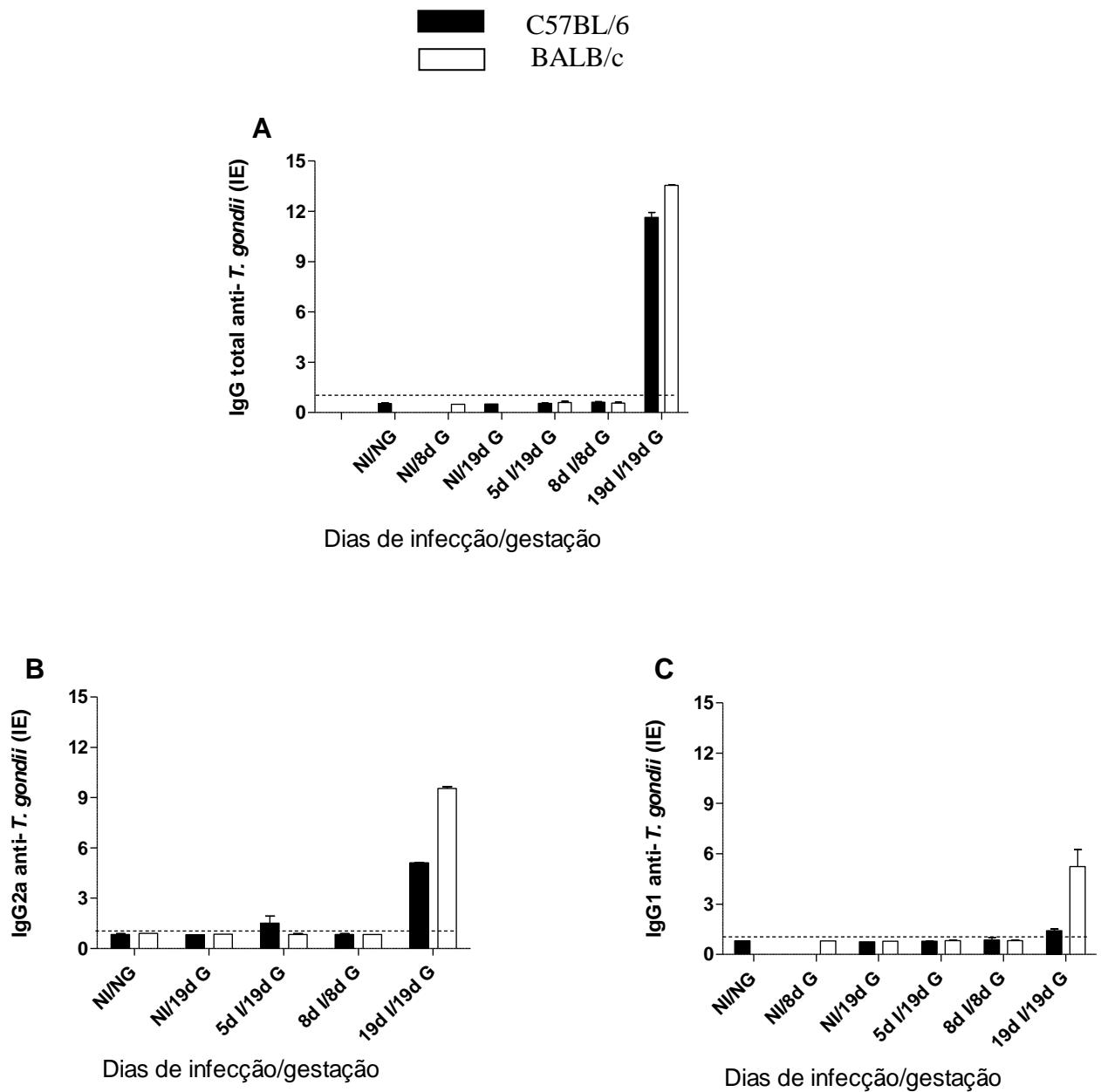


Figura 9: Níveis de IgG total (A), IgG2a (B) e IgG1 (C) anti-*T. gondii* em amostras de soro de fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c não gestantes e não infectadas, aos 8 e 19 dias de gestação e não infectadas e aos 8 dias de infecção e gestação, 5 dias de infecção e gestação e 19 dias de infecção e gestação. As fêmeas foram infectadas com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral, o soro foi coletado nos tempos indicados e os níveis de anticorpos foram mensurados pelo teste ELISA. Dias de infecção (d I), Dias de gestação (d G); Não infectadas (NI); Não gestantes (NG).

6. DISCUSSÃO

Sabendo que camundongos C57BL/6 são suscetíveis enquanto que BALB/c são resistentes à infecção por *T. gondii*, foram realizados estudos para analisar os resultados da gestação, parâmetros imunológicos e alterações inflamatórias, quando fêmeas de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 são infectadas no início e terço final da gestação. Este trabalho demonstrou que a infecção por *T. gondii* prejudica o processo gestacional em ambas as linhagens de camundongos, mas este prejuízo é mais acentuado nas fêmeas C57BL/6.

Aos 19 dias de gestação apenas uma fêmea de camundongo C57BL/6 entre 9 que foram infectadas no dia da detecção da rolha vaginal, consideradas como gestantes, apresentou feto no útero, demonstrando que estas foram mais afetadas pelo parasito quando comparadas às fêmeas de camundongos BALB/c. Para investigar se esse prejuízo gestacional foi devido à carga parasitária no útero e placenta, o parasitismo tecidual local nas fêmeas de camundongos gestantes e infectadas foi analisado por imunohistoquímica e foi observado que a presença de parasitos foi raramente observada nestes tecidos em fêmeas C57BL/6 e BALB/c nas fases tardias de gestação e infecção.

Uma investigação realizada em ovelhas não encontrou evidências da presença de *T. gondii* em tecidos abortados na fase aguda da infecção, sugerindo que a morte fetal ocorre antes da placenta ou do feto serem invadidos pelo parasito (OWEN, CLARKSON, TREES, 1998). Deste modo, além da infecção vertical, existem outros fatores que podem contribuir para a ocorrência de abortos durante a infecção por *T. gondii* (GE et al., 2008).

No presente trabalho foi demonstrado que quando os animais BALB/c e C57BL/6 são infectados no 14º dia de gestação e analisados com 19 dias de gestação, conseqüentemente 5 dias de infecção, não foram observadas alterações na gestação. Entretanto, com 8 dias de gestação e infecção as fêmeas C57BL/6 começam a apresentar alterações inflamatórias, diferentemente do observado nas fêmeas BALB/c, as quais não apresentaram alterações, embora, em todas as condições experimentais o parasito tenha sido raramente encontrado por imunohistoquímica no útero e placenta em ambas as linhagens. Foi previamente estabelecido que as alterações patológicas são mais comuns e mais graves na placenta do que no feto e que os danos placentários são, provavelmente, as causas primárias de morte fetal (LOKE, 1982).

Diferente de nossos estudos, a maioria dos dados da literatura em infecção congênita experimental de camundongos por *T. gondii*, tem sido obtidos infectando-se os animais a partir do 7º dia de gestação. Quando camundongos BALB/c e C57BL/6 foram oralmente

inoculados com 30 cistos da cepa Fukaia no 7º e 11º dias de gestação, *T. gondii* foi detectado, por PCR, somente no útero e placenta dos camundongos C57BL/6, 7 dias após a infecção (SHIONO et al., 2007). A detecção diferencial do parasito no útero e placenta observada no presente estudo está provavelmente relacionada ao tempo de gestação no momento da infecção e da carga parasitária utilizada. No presente trabalho experimental os camundongos foram infectados no 1º e 14ª dias de gestação com apenas 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e o método de detecção do parasito por imunohistoquímica utilizado neste trabalho é menos sensível que a detecção de DNA do parasito por PCR. O parasitismo pela cepa Fukaia de *Toxoplasma*, nas placentas de fêmeas de camundongos infectadas por via oral com 20 cistos no estágio tardio da gestação (infecção na 2ª semana de gestação) foi maior do que nas fêmeas infectadas nos estágios precoces da gestação (7 dias) tanto na linhagem C57BL/6 quanto BALB/c (HE et al., 1997). Isto, provavelmente é devido ao período da gestação no qual a infecção ocorre, uma vez que as chances de transmissão do parasito aumentam com o avanço da gestação (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Quando fêmeas de camundongos C57BL/6 gestantes foram inoculadas com a cepa RH aos 8 dias de gestação, o parasito foi detectado nos filhotes dos camundongos com 2, 4 e 6 dias após a infecção (GE et al., 2008). Foi previamente demonstrado que *T. gondii* é detectado nos fetos de camundongos BALB/c (63,9%) no 18º dia de gestação e 7 dias de infecção com a cepa PRU (tipo II) (ABOU-BACAR et al., 2004b).

Sabendo que os danos na placenta podem ser as causas primárias de morte fetal, as reações inflamatórias no útero e placenta de fêmeas C57BL/6 e BALB/c gestantes e infectadas foram analisadas. Foi observado que quando os camundongos são inoculados no 1º dia de gestação e o útero e sítios de implantação são analisados no 8º dia de infecção e gestação, os camundongos C57BL/6 apresentaram alta infiltração de células inflamatórias nestes locais e alguns sítios de implantação apresentaram-se em processo de necrose, o que não foi observado nas fêmeas da linhagem BALB/c. Os sítios de reabsorção são identificados pelos seus pequenos tamanhos e aparência hemorrágica e necrótica, quando comparados com embriões e placentas normais, de acordo com Joachim e colaboradores (2001); Zenclussen e colaboradores (2002). Quando fêmeas Swiss-Webster são oralmente infectadas com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no primeiro dia de gestação, a infecção induz redução no tamanho do sítio de implantação e hemorragia local, indicando reabsorção fetal e o índice de reabsorção aumenta de 8% aos 8 dias de infecção e gestação para 75% aos 16 dias de infecção e gestação, ao contrário, não são observados sítios de reabsorção nos animais controle (SENEGAS et al., 2009). Esses dados estão de acordo com nossos resultados que

demonstraram um maior índice de reabsorção fetal quando as fêmeas de camundongos são infectadas no 1º dia de gestação.

Quando fêmeas de camundongos C57BL/6 são infectadas intraperitonealmente com 10^4 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* no 8º dia de gestação, com 2 dias após a infecção não há anormalidades fetais visíveis, porém, aos 4 dias após a infecção alguns embriões e placentas exibem aparência hemorrágica enquanto que com 6 dias após a infecção todos os fetos e placentas dos animais infectados se apresentam de forma necrótica e hemorrágica e são reabsorvidos, sendo o índice de aborto significativamente maior nas fêmeas aos 6 dias após a infecção comparadas às fêmeas controle (GE et al., 2008). Esses dados indicam que a cepa RH é também mais prejudicial para placenta e feto que a cepa ME-49.

Na presente investigação, o pulmão e SNC foram também analisados quanto à patologia e parasitismo. Recentemente, observamos que as fêmeas de camundongos C57BL/6 desenvolvem alterações inflamatórias mais graves no pulmão e SNC quando comparadas com as fêmeas de camundongos BALB/c (SILVA et al., 2010). Para observar se a gestação interfere na resposta inflamatória a *T. gondii* nos órgãos periféricos e SNC, estes órgãos foram examinados e foi observado que a inflamação no pulmão foi estatisticamente maior aos 8 dias após o inóculo do parasito, coincidente com a alta carga parasitária neste órgão no mesmo período, e crescente com a progressão do curso da infecção, reforçando o fato de que camundongos C57BL/6 desenvolvem alterações inflamatórias mais intensas no pulmão, também quando gestantes, quando comparados aos camundongos BALB/c. Em relação ao SNC, foi observada maior inflamação aos 19 dias de gestação e infecção nas fêmeas de camundongos C57BL/6 em relação às fêmeas BALB/c, coincidindo com a alta carga parasitária neste órgão no mesmo período e maior suscetibilidade dos animais C57BL/6.

Estudos prévios envolvendo camundongos BALB/c (H2^d) e C57BL/6 (H2^b) e as linhagens congênicas CB10-H2 (H2^b) e C57BL/KsJ (H2^d), confirmaram os dados de que as linhagens de camundongos que expressam o haplotipo 'd' são mais resistentes a infecção pela cepa ME49 de *T. gondii* do que camundongos que expressam o haplotipo 'b' (RESENDE et al., 2008). O presente estudo demonstra o resultado inflamatório nos órgãos de animais em infecção congênita experimental em camundongos resistentes e suscetíveis, comparativamente, e sugere que o haplotipo do MHC também influencia o resultado da gestação em infecção por *T. gondii*.

Com o objetivo de verificar se as maiores alterações inflamatórias observadas nos camundongos C57BL/6 estão relacionadas com a produção diferencial de citocinas, os níveis

das mesmas foram mensuradas nas amostras de soro dos animais experimentais. Fêmeas de camundongos BALB/c apresentaram níveis elevados de IL-6 no 5º dia de infecção e 19 dias de gestação. Os resultados mostraram que ambas as linhagens apresentaram altos níveis de IFN- γ e IL-6 no 8º dia de gestação e infecção quando comparadas às fêmeas de camundongos não infectadas.

Estudos utilizando linhagens de células endoteliais microvasculares humanas (HMEC) demonstraram que nos casos de pré-eclampsia a morte dos trofoblastos ocorre por meio de processos de necrose e que a fagocitose dos trofoblastos necróticos induz a ativação de células endoteliais juntamente com a liberação da citocina IL-6 a partir destas células. Além disso, a IL-6, em sinergia com TGF- β , ajuda a regular as respostas maternas para a eliminação das células trofoblásticas em processo de necrose nos casos de gestações anormais (CHE et al., 2010). No nosso estudo experimental, aos 8 dias de infecção e gestação a produção de IL-6 foi alta e similar para ambas as linhagens, no entanto o aumento da produção desta citocina foi significativamente maior nas fêmeas da linhagem C57BL/6 quando comparadas às fêmeas não gestantes e não infectadas da mesma linhagem. Isto sugere que a alta produção de IL-6 nas fêmeas da linhagem C57BL/6 aos 8 dias de infecção e gestação esteja relacionada com a tentativa do organismo materno em eliminar os trofoblastos necróticos uma vez que esta linhagem apresenta, neste período, sítios de implantação em processo de necrose devido à gestação anormal que é desenvolvida frente à infecção por *T. gondii*. Entretanto, os níveis de IL-6 foram semelhantes entre as fêmeas das linhagens C57BL/6 e BALB/c, sendo que as fêmeas BALB/c não apresentam processos de necrose nos sítios de implantação aos 8 dias de infecção e gestação. Um fato interessante foi a elevada detecção de IL-6 no soro dos animais BALB/c aos 5 dias de infecção e gestação isso pode significar uma maior proteção desses animais frente a gestação e infecção em comparação aos animais C57BL/6 neste período de gestação e infecção.

Embora não tenha sido detectada diferença estatística, as fêmeas C57BL/6 apresentaram níveis aparentemente maiores de IFN- γ quando comparadas com as fêmeas BALB/c aos 8 dias de gestação e infecção. Estes dados estão de acordo com os anteriormente obtidos, demonstrando que na ausência de IFN- γ os animais desenvolvem menores alterações inflamatórias nos órgãos periféricos (SILVA et al., 2009). Além disso, estudos anteriores demonstraram que camundongos gestantes IFN- $\gamma^{-/-}$ não apresentam aborto quando infectados aos 7 e 11 dias de gestação com 30 cistos da cepa Fukaia de *T. gondii*, embora o parasito tenha sido encontrado nos tecidos fetais, indicando que IFN- γ é uma citocina que provoca

aborto, além disso, quando se compara a expressão de mRNA para IFN- γ na placenta, verifica-se que fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentam alta expressão da citocina comparadas às fêmeas BALB/c com 7 dias de infecção e 18 dias de gestação (SHIONO et al., 2007).

Quando camundongos ICR-JCL são inoculados intraperitonealmente no 10^o e 13^o dias de gestação com taquizoítas da cepa S-273, as fêmeas de camundongos gestantes demonstraram ser mais suscetíveis do que as fêmeas virgens, as quais apresentaram altos níveis de IFN- γ na corrente sanguínea (SHIRAHATA et al., 1992). Ainda, camundongos C57BL/6 infectados intraperitonealmente com 10⁴ taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* no 8^o dia de gestação, após um aumento inicial com 2 dias após a infecção, os níveis de IFN- γ no soro das fêmeas gestantes e infectadas aumentam ainda mais, atingindo níveis significativamente maiores com 4 e 6 dias pós infecção comparadas às fêmeas do grupo controle (GE et al., 2008). Por outro lado, a produção de IL-2 é acentuadamente suprimida durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* nos camundongos e a administração de rHuIL-2 às fêmeas de camundongos gestantes aumentou a resistência do hospedeiro à mudanças letais provocadas por esse parasito (SHIRAHATA et al., 1993).

Em relação à citocina TNF observou-se aos 8 dias de infecção e gestação e aos 19 dias de infecção e gestação, níveis significativamente maiores nas fêmeas da linhagem C57BL/6 comparadas às fêmeas BALB/c. Esses dados sugerem que níveis sistêmicos mais elevados de IFN- γ e TNF nos animais C57BL/6 podem estar relacionados a alterações inflamatórias mais graves nesta linhagem e ao maior prejuízo gestacional em infecção por *T. gondii*.

Os níveis elevados de TNF nos animais C57BL/6 aos 8 e 19 dias de infecção e gestação, podem atuar juntamente com outras citocinas de perfil Th1 e desencadear respostas inflamatórias exacerbadas e prejudiciais ao processo de gestação. Estudos prévios com fêmeas da linhagem CBA/J acasaladas com machos da linhagem DBA/2 de camundongos demonstraram que as fêmeas, quando sofrem depleção de células NK apresentam diminuição nos índices de aborto e, nessa condição, TNF não apresenta efeito significativo, uma vez que esta citocina ativa células NK que por sua vez provocam a morte do embrião (CLARK et al., 1990). Outros estudos demonstraram que quando fêmeas da linhagem CBA/J acasaladas com machos da linhagem DBA/2J de camundongos são submetidas a estresse provocado por sons ultrassônicos repelentes para roedores durante 24 horas aos 5 dias e meio de gestação, esse estresse provoca aumento significativo nos índices de aborto analisados aos 13 dias e meio de

gestação mediado pela liberação da substância neurotransmissora P a qual induz aumento da produção de TNF pelas células TCD8⁺ na decídua (JOACHIM et al., 2001).

Para verificar os níveis adequados de TNF endógeno derivado de macrófagos, outros experimentos foram realizados com o cruzamento das mesmas linhagens (fêmeas CBA/J acasaladas com machos DBA/2) com a adição da citocina IFN- γ e demonstraram que IFN- γ por si só é capaz de induzir abortos, entretanto, nas fêmeas com depleção das células NK, IFN- γ falhou na indução de aborto. Contudo, quando as citocinas IFN- γ e TNF foram administradas juntas, mais de 80% dos embriões implantados sofreram aborto, o que sugere uma sinergia obrigatória e dependente entre ambas as citocinas (CLARK et al., 1998). Deste modo, novos experimentos precisam ser realizados a fim de detectar os níveis destas citocinas na interface materno-fetal quando fêmeas de camundongos são infectadas no primeiro dia de gestação, uma vez que os níveis de citocinas sistêmicas podem não refletir fielmente os níveis das mesmas no útero e placenta.

Quanto à citocina IL-10 observou-se níveis mais elevados aos 5 dias de infecção e gestação nas amostras de soro dos camundongos C57BL/6 e BALB/c, sendo que os níveis apresentaram-se relativamente maiores nas fêmeas da linhagem C57BL/6. Aos 5 e 8 dias de infecção e 19 e 8 dias gestação, respectivamente, as fêmeas da linhagem C57BL/6 apresentaram um aumento relativamente maior da citocina IL-10 em relação às fêmeas BALB/c, enquanto que aos 19 dias de infecção e gestação, os níveis de IL-10 apresentaram-se maiores nas fêmeas da linhagem BALB/c. Nossos resultados sugerem que, frente a infecção por *T. gondii* durante o período gestacional há maior produção de citocinas de perfil Th1, o que prejudica o processo de gestação podendo influenciar nos índices de aborto verificados nos animais experimentais, mais agravantes nas fêmeas da linhagem C57BL/6. Aos 19 dias de infecção e gestação verifica-se que a produção de IL-10 apresenta-se relativamente maior nas fêmeas da linhagem BALB/c, o que poderia estar relacionado com o melhor resultado gestacional destas fêmeas nesta fase de gestação e infecção quando comparadas às fêmeas C57BL/6. De fato, evidências recentes demonstram que as células Th1 controlam a si mesmas por meio da produção de IL-10 para limitar os danos aos hospedeiros durante as reações inflamatórias e controlar as respostas imunes contra a infecção por *Leishmania major* e *T. gondii* (O'GARRA; VIEIRA, 2007).

Fêmeas de camundongos gestantes apresentam um acentuado e significativo aumento na suscetibilidade à infecção intravenosa com taquizoítas da cepa C37 de *T. gondii* quando são inoculados com 14 e 16 dias de gestação (LUFT; REMINGTON, 1982). Além disso, o

número de reabsorção fetal é significativamente maior nas fêmeas C57BL/6 infectadas por *Leishmania major* quando comparadas às fêmeas BALB/c. Esse resultado está associado à diminuição da produção de citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) pelas células da placenta e aumento na produção de IFN- γ e TNF (KRISHNAN et al., 1996b).

De acordo com o experimento realizado por Senegas e colaboradores (2009), quando fêmeas de camundongos Swiss-Webster gestantes são infectadas via oral com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no primeiro dia de gestação, os níveis uterinos das citocinas IL-6, TNF, IL-4 e IL-10 são similares aos níveis destas citocinas produzidas nas fêmeas gestantes e não infectadas. Ao contrário, os níveis de produção de IFN- γ são significativamente maiores tanto no soro quanto nos tecidos uterinos das fêmeas com 10 dias de gestação e infecção quando comparadas às fêmeas controle. Neste mesmo período de infecção e gestação, as fêmeas apresentam baixa carga parasitária nos sítios de reabsorção, o que demonstra que a reabsorção fetal precoce não ocorre devido aos efeitos diretos da proliferação do parasito no útero, mas sim devido à ação de IFN- γ (SENEGAS et al., 2009). Estes dados estão de acordo com o nosso estudo, uma vez que aos 8 dias de infecção e gestação, raramente foram observados parasitos no útero das fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, porém, neste mesmo período, os níveis sorológicos de IFN- γ , TNF e IL-6 apresentaram-se relativamente altos quando comparados às demais condições experimentais e citocinas analisadas. Além disso, as fêmeas C57BL/6 apresentaram maiores níveis de IFN- γ e TNF aos 8 dias de gestação e infecção e processos de necrose nos sítios de implantação quando comparadas às fêmeas BALB/c, sugerindo que ambas as citocinas podem ter contribuído para os maiores danos gestacionais observados nas fêmeas da linhagem C57BL/6.

As citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 são importantes para controlar a infecção por parasitos nas fêmeas de camundongos gestantes, no entanto, a resposta imune induzida por *T. gondii* e outros parasitos em certas linhagens pode ser prejudicial ao processo de gestação, o qual exibe um perfil de resposta preferencialmente Th2.

Quando os isotipos IgG específicos para *T. gondii* foram analisados, nós observamos que a imunoglobulina foi detectada somente no 19º dia de gestação e infecção e que as fêmeas C57BL/6 apresentam menores níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos para *T. gondii* comparadas às fêmeas BALB/c. Embora os taquizoítas livres possam ser efetivamente eliminados, pelo menos em parte, a partir da fagocitose por macrófagos mediada por anticorpos (ANDERSON; BAUTISTA; REMINGTON, 1976), o baixo nível de anticorpos pode contribuir para o alto parasitismo verificado no pulmão e SNC das fêmeas de

camundongos C57BL/6. Além disso, ambas as linhagens de camundongos apresentaram altos níveis de IgG2a comparados à IgG1, o que confirma a habilidade do parasito em induzir resposta imune de perfil Th1, independente do background genético do camundongo e da influência da gestação. Resultados similares foram observados quando camundongos C57BL/6 e BALB/c não gestantes são infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* por via intraperitoneal (dados não apresentados).

Uma vez verificado que fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentam maiores danos gestacionais quando comparadas às fêmeas BALB/c, a infiltração de mastócitos foi investigada no útero e placenta das fêmeas de camundongos gestantes e infectadas, uma vez que estudos prévios demonstraram que a desgranulação dos mastócitos está relacionada com o processo de angiogênese no cérvix uterino de ratos durante a gestação e que o fenótipo celular é predominantemente observado durante a segunda metade da gestação em zonas perivasculares (VARAYOUD et al., 2004). A desgranulação dos mastócitos está associada com a expressão de mRNA para o fator de crescimento endotelial vascular (VEG-F) (BOSQUIAZZO et al., 2007) e a angiogênese ocorre regularmente em associação com alterações clínicas do endométrio de fêmeas adultas e, também, durante a implantação e subsequente placentação (HERYANTO; ROGERS, 2002).

No nosso trabalho experimental foi verificado que o número de mastócitos apresenta uma diminuição quando os animais estão gestantes, em qualquer tempo de gestação, mostrando que em camundongos provavelmente essas células não teriam um papel importante para o sucesso da implantação e gestação, diferente de dados da literatura mostrando a importância destas células no processo de angiogênese (VARAYOUD et al., 2004). Entretanto, com a infecção observou-se um aumento destas células em fêmeas de camundongos C57BL/6 e o número destas células foi maior no útero e placenta comparada às fêmeas BALB/c em infecção por *T. gondii*. Além disso, o número de mastócitos no útero aumenta com o progresso da gestação e infecção nas fêmeas C57BL/6 e essa quantidade é significativamente maior nesta linhagem aos 8 e 19 dias de infecção e gestação quando comparadas às fêmeas BALB/c.

Interessante é o fato de que o índice de desgranulação é maior no 8º dia de gestação e infecção em ambas as linhagens de camundongos e é menor no 19º dia de gestação e infecção, e o índice de desgranulação nos camundongos é menor nos animais C57BL/6 aos 8 dias de gestação e infecção e duas vezes maior nos animais C57BL/6 aos 19 dias de gestação e infecção quando comparados aos animais BALB/c. Além disso, é importante considerar que o número de mastócitos foi sempre maior nos animais C57BL/6 em relação aos animais

BALB/c. Estudos anteriores demonstraram que quando os mastócitos são cultivados *in vitro* na presença de *T. gondii*, o parasito induz a desgranulação deste tipo celular, liberando leucotrienos e estes mediadores são capazes de controlar o parasito (HENDERSON; CHI, 1998). A maior desgranulação de mastócitos observada no 8º dia de gestação pode estar relacionada ao controle do parasito, pois este é raramente encontrado no útero/placenta dos animais infectados.

Quando *Calomys callosus* são infectados intraperitonealmente com a cepa RH de *T. gondii*, os mastócitos são encontrados entre as células coletadas no peritônio até 48 horas de infecção e o fenótipo celular exibido é fortemente desgranulado (FERREIRA et al., 2004). Nossos resultados contrastantes, que demonstram diminuição do processo de desgranulação dos mastócitos nas fases tardias da gestação e infecção, podem estar associados com a presença de diferentes fenótipos celulares na cavidade peritoneal comparados aos do tecido conjuntivo. Ou este fato pode estar relacionado aos mediadores imunes produzidos pela infecção por *T. gondii* ao invés da presença do parasito propriamente dita, bem como pelo próprio processo de gestação, o qual gera uma série de modificações das respostas imunes a favor do desenvolvimento do feto semialogênico.

Fêmeas de camundongos CBA/J submetidas a estresse aos 5 dias e meio de gestação apresentam um aumento leve no número de mastócitos desgranulados quando analisadas aos 13 dias e meio de gestação (segunda metade da gestação) quando comparadas às fêmeas controles que não sofreram estresse (JOACHIM et al., 2001). Estes dados estão de acordo com o nosso trabalho uma vez a presença de mastócitos desgranulados é observada aos 8 dias de infecção e gestação e é significativamente maior nas fêmeas da linhagem C57BL/6 quando comparadas as BALB/c.

Muitos mediadores podem ser produzidos pelos mastócitos, dentre eles TNF, TGF- β , MIP-1 α (CCL3), VPF/VEGFd, FGF-2d, LIF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF, MCP-1 (CCL2), IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-25 entre outros, e vários desses produtos, inclusive TGF- β , IL-4 e histamina podem ter efeitos anti-inflamatórios e/ou regular negativamente aspectos da resposta imune adquirida (GALLI et al., 2005).

Fêmeas virgens de camundongos C57BL/6 infectadas com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral e tratadas com um inibidor da enzima iNOS apresentaram aumento no número de cistos cerebrais e produção reduzida de óxido nítrico e IFN- γ , por outro lado, fêmeas virgens BALB/c, sob as mesmas condições, não apresentaram nenhuma modificação relevante, sugerindo que o óxido nítrico modula a produção de IFN- γ nos camundongos

C57BL/6 infectados e está envolvido na modulação das respostas protetoras em camundongos suscetíveis a toxoplasmose, mas não nas linhagens resistentes, durante a fase aguda da infecção (KANG et al., 2004).

No nosso estudo, embora a produção de óxido nítrico não tenha sido quantificada, a expressão da enzima iNOS foi qualitativamente analisada por imunohistoquímica e não foram observadas diferenças na produção entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c aos 8 e 19 dias de infecção e gestação, uma vez que ambas as linhagens apresentaram expressão de iNOS nos sítios de implantação. Além disso, foi verificada a expressão da enzima na placenta de fêmeas gestantes e não infectadas, tanto aos 8 quanto aos 19 dias de gestação em ambas as linhagens. Porém, apesar de não haver diferença quanto a expressão de iNOS, é notável que aos 8 dias de gestação e infecção as fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentaram maiores alterações inflamatórias e processos de necrose no útero e sítios de implantação e aos 19 dias de infecção e gestação as fêmeas desta linhagem apresentam um índice de aborto igual a 90% quando comparadas às fêmeas da linhagem BALB/c. Portanto, os resultados sugerem que a enzima parece estar relacionada aos processos normais de implantação do embrião e parece não estar relacionada aos processos necróticos verificados nas fêmeas C57BL/6.

A produção de óxido nítrico no cérvix uterino é baixa durante os estágios iniciais da gestação e aumenta de acordo com o avanço da gestação (MAUL et al., 2003). Garfield e colaboradores (1998) sugerem que o óxido nítrico seja um mediador local importante no útero e cérvix uterino durante a gestação e parto, uma vez que, no útero, juntamente com a progesterona, o óxido nítrico inibe a contratibilidade uterina enquanto que nas fases tardias da gestação e pré-parto, a produção de óxido nítrico no útero e na placenta diminui, permitindo com o que o parto aconteça. Além disso, o óxido nítrico previne a desgranulação dos mastócitos (COLEMAN, 2002). Varayoud e colaboradores (2004) propõem que a ausência de óxido nítrico no cérvix uterino até a segunda metade da gestação pode ser necessária para que os mastócitos exerçam seus efeitos estimuladores no processo de angiogênese.

Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa RH no 8º dia de gestação ou tratadas com antígeno excretório-secretório (ESA) apresentaram redução de células T reguladoras (T reg) na interface materno-fetal e alta taxa de aborto (GE et al., 2008). Uma hipótese seria que, entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c, ocorra infiltração diferencial das células T reg na interface materno-fetal durante a infecção por *T. gondii*, portanto, esta questão deve ser investigada.

Os resultados deste trabalho demonstram que as fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentam maiores prejuízos gestacionais em relação às fêmeas BALB/c e que este

fenômeno parece estar associado a maior produção de IFN- γ e TNF sistêmicas e menor produção de IL-10, o que contribui para um processo inflamatório exacerbado nos órgãos periféricos, SNC e necrose dos tecidos uterinos e placentários. Além disso, a maior infiltração de mastócitos no útero/placenta das fêmeas gestantes e infectadas pode estar relacionada ao controle do parasito, ao menos parcialmente e conseqüentemente menor detecção de *T. gondii* neste sítio de infecção.

7. CONCLUSÕES

- Fêmeas da linhagem C57BL/6 apresentaram maior reabsorção fetal e, conseqüentemente, menor número de fetos no útero em comparação com camundongos BALB/c em infecção oral por *T. gondii*, principalmente quando esta ocorre no período inicial da gestação.
- Fêmeas de camundongo C57BL/6 apresentam alta carga parasitária no pulmão e SNC comparadas às fêmeas de camundongo BALB/c, mas parasitismo tecidual similar no útero e placenta;
- Fêmeas de camundongo C57BL/6 apresentam maior infiltração de leucócitos no útero e alguns animais apresentam processos de necrose nos sítios de implantação aos 8 dias de gestação e infecção por *T. gondii* comparadas às fêmeas BALB/c;
- A infecção por *T. gondii* induz maior infiltração de mastócitos no útero/placenta das fêmeas de camundongo C57BL/6, conseqüentemente maior número destas células desgranuladas comparadas às fêmeas de camundongo BALB/c;
- A expressão da enzima iNOS parece estar envolvida nos processos de implantação e desenvolvimento normal do embrião uma vez que a enzima foi observada nos sítios de implantação, bem como na placenta das fêmeas gestantes, infectadas ou não por *T. gondii*, demonstrando que a expressão de iNOS parece não ter relação com os processos de aborto. Além disso, não houve diferença na expressão da proteína em ambas as linhagens de camundongos;
- Fêmeas da linhagem BALB/c produzem maiores níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos para *T. gondii* quando comparadas às fêmeas da linhagem C57BL/6, sugerindo que a maior produção de imunoglobulinas específicas podem estar relacionadas ao menos parcialmente ao controle do parasito;

- As fêmeas de camundongos C57BL/6 apresentaram níveis sorológicos mais elevados de IFN- γ e TNF aos 8 dias de gestação e infecção quando comparadas com fêmeas de camundongos BALB/c, o que pode estar relacionado à maior inflamação e necrose dos sítios de implantação e maior índice de reabsorção fetal. Associado a isso, camundongos C57BL/6 apresentaram níveis inferiores de IL-6 aos 5 dias de infecção e 19 dias de gestação, porém, ambas as linhagens apresentam altos níveis de produção de IL-6 aos 8 dias de infecção e gestação. Além disso, a produção de IL-10 aos 19 dias de gestação e infecção nas amostras de soro das fêmeas C57BL/6 é menor quando comparada às fêmeas BALB/c, o que pode estar relacionado ao maior índice de reabsorção fetal nas fêmeas da linhagem C57BL/6.

8. BIBLIOGRAFIA*

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. **Infection and Immunity**, v. 3, p. 1397 – 1401, 2004a.

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; RAJAPAKSE, R.; ANTONI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI. Role of gamma interferon and T cells in congenital *Toxoplasma* transmission. **Parasite Immunology**, v. 26, p. 315 – 318, 2004b.

ANDERSON, S. E. Jr.; BAUTISTA, S. C.; REMINGTON, J. S. Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v 26, p. 375 – 380, 1976.

ANDRADE, G. M. Q.; TONELLI, E.; ORÉFICE, F. Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência. Rio de Janeiro, **Medsa**, p. 1297 – 1339, 2000.

ANDRADE, G. M. Q.; CARVALHO, A. L.; CARVALHO, I. R.; NOGUEIRA, M. G.; ORÉFICE, F. Toxoplasmose congênita – orientação prática sobre prevenção e tratamento. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, p. 85 – 91, 2004.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 9, p. 55- 62, 2003.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, p. 624 – 630, 2007.

BENEVIDES, L.; MILANEZI, C. M.; YAMAUCHI, L. M.; BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; SILVA, N. M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **Immunopathology and Infectious Disease**, v. 173, p. 741 – 751, 2008.

BOOTHROYD, J. C. Expansion of host ranges as a driving force in the evolution of *Toxoplasma*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 179 – 184, 2009.

*Segundo normas da ABNT, 2002

BOSQUIAZZO, V. L.; RAMOS, J. G.; VARAYOUD, J.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. **Reproduction**, v. 133, p. 1045 – 1055, 2007.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1457 - 1467, 2001.

BUHIMSCHI, I.; ALI, M.; JAIN, V.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R. E. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. **Human Reproduction**, v. 11, p. 755 – 1766, 1996.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblast. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, p. 114 – 123, 1997.

CHATTERTON, J. M. W. Pregnancy. In: HO-YEN D. O.; JOSS, A. W. L. editors. **Human toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 144 – 183, 1992.

CHE, Q.; CHEN, L.; LIU, B.; VIALLI, C.; STONE, P.; CHING, L. M.; CHAMLEY, L. The role of autocrine TGF β 1 in endothelial cell activation induced by phagocytosis of necrotic trophoblasts: a possible role in the pathogenesis of pre-eclampsia. **Journal of Pathology**, v. 221, p. 87 – 95, 2010.

CLARK, D. A.; LEA, R. G.; PODOR, T.; DAYA, S.; BANWATT, D.; HARLEY. Cytokines determining the success or failure of pregnancy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 626, p. 524 – 536, 1990.

CLARK, D. A.; CHAOUAT, G.; ARCK, P. C.; MITTRUECKER, H. W.; LEVY, G. A. Cutting Edge: Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 545 – 549, 1998.

COLEMAN, J W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1397 – 1406, 2001.

COLEMAN, J W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, p. 4 - 10, 2002.

D'HAUTERIVE, P. S.; CHARLAT-RENARD, C.; GOFFIN, F.; FOIDART, M.; GEENEN, V. La fenêtre implantatoire. **Journal Gynecology Biology Reproduction**, v. 31, p. 440 - 455, 2002.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPERR, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology Reviews**, v. 11, p. 267 - 299, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 126, p. 57 – 72, 2004.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÉTRE, A.; YEAR, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: Case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 280 – 285, 2009.

EVENGARD, B.; PETERSSON, K.; ENGMAN, M. L.; WIKLUND, S.; IVARSSON, S. A.; TEÄR-FAHNEHJELM, K.; FORSGREN, M.; GILBERT, R.; MALM, G. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. **Epidemiology and Infection**, v. 127, p. 121 – 127, 2001.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 355 – 359, 2002.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908 – 2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 133 – 148, 2009a.

FERGUSON, D. J. P. Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*: Small science, large characters. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 871 – 875, 2009b.

FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R.; OLIVEIRA, J. G.; FERRO, E. A. V.; SOUZA, M. A.; SANTOS, A. A. D. *Toxoplasma gondii* and mast cells interactions in vivo and in vitro: experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Microbes and Infection**, v. 6, p. 172 – 181, 2004.

FERREIRA, I. M.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; HIRAMOTO, R. M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 22122 – 22127, 2008.

FROSSI, B.; GRI, G.; TRIPODO, C.; PUCILLO, C. Exploring a regulatory role for mast cells: ‘MCregs’? **Trends in immunology**, v. 31, p. 97 - 102, 2010.

FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T. Role of cytokines and major histocompatibility complex restrictin in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6392 – 6401, 2003.

GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M. M.; TSAI, M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annual Review of immunology**, v. 23, p. 749 – 786, 2005.

GARFIELD, R. E.; SAADE, G.; BUHIMSCHI, C.; BUHIMSCHI, I.; SHI, L.; SHI, S. Q.; CHWALISZ, K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 673 - 695, 1998.

GE, Y. Y.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; WU, J. P.; TAN, M. J.; HU, W.; LIANG, Y. J.; WANG, Y. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 471 – 481, 2008.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161 – 165, 2001.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of the stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 40, p. 67 – 70, 2004.

HE, N.; AOSAI, F.; LUO, W. T.; UEDA, M.; YANG, T. H.; YAMASHITA, K.; SEKIYA, S.; YANO, A. Parasite load in pregnant mice infected by *Toxoplasma gondii* assayed by quantitative competitive-PCR. **Parasitology International**, v. 46, p. 143 – 147, 1997.

HENDERSON, W. R. Jr.; CHI, E. Y. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* cytotoxicity. **Journal of Infectious Diseases**. v. 177, p. 1437 – 1443, 1998.

HERYANTO, B.; ROGERS, P. A. Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. **Reproduction**. v. 123, p. 107 – 113, 2002.

HIDE, G.; MORLEY, E. K.; HUGUES, J. M.; GERWASH, O.; ELMAHAISHI, M. S.; ELMAHAISHI, K. H.; THOMASSON, D.; WRIGHT, E. A.; WILLIAMS, R. H.; MURPHY, R. G.; SMITH, J. E. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 136, p. 1877 – 1885, 2009.

HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 5193 – 5198, 1996.

HOWE, D. K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411 – 1414, 1997.

JOACHIM, R. A.; HILDEBRANDT, M.; ODER, J.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8⁺ TNF- α ⁺ decidual cells via substance P. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 45, p. 303 – 309, 2001.

JONES, J. S.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 56, p. 296 – 305, 2001.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10 – 25, 2010.

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J. P.; DARDE, M. L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 14872 – 14877, 2007.

KANG, K. M.; LEE, G. S.; LEE, J. H.; CHOI, I. W.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. Effects of iNOS inhibitor on IFN- γ production and apoptosis of splenocytes in genetically different strains of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 42, p. 175 – 183, 2004.

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 responses and increased production of T helper 2 cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 644 – 652, 1996a.

KRISHNAN, L. GUILBERT, L. J.; WEGMANN, T. G.; BELOSEVIC, M.; MOSMANN, T. R. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 653 – 662, 1996b.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHI, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 11423 – 11428, 2006.

LIN, H.; MOSMANN, T. R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPIPAT, S.; WEGMANN, T. G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **Journal Immunology**, v.151, p.4562-4573, 1993.

LOKE, Y. W. Transmission of parasites across the placenta. **Advances in Parasitology**, v. 21, p. 155 – 228, 1982.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. **Infection and Immunity**, v. 38, p. 1164 – 1171, 1982.

- LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, v.21, p.3352-3357, 2003.
- MAUL, H.; LONGO, M.; SAADE, G. R.; GARFIELD, R. E. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 359 – 380, 2003.
- MAYRL, S. I.; ZUBERIL, R. I.; LIU, F. T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 821 – 827, 2003.
- MILLER, C. M.; SMITH N. C.; JOHNSON, A. M. Cytokine, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in *Toxoplasma*. **Parasitology Today**, v. 15, p. 418 - 422, 1999.
- MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 23 – 39, 2009.
- MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273P.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109 – 142, 1991.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965 – 1979, 2004.
- O’GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 425 – 428, 2007.
- OWEN, M. R.; CLARKSON, M. J.; TRESS, A. J. Acute phase *Toxoplasma* abortions in sheep. **The Veterinary Record**, v. 142, p. 480 – 482, 1998.
- PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561 – 569, 2008.
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and neonatal Medicine**, v. 12, p. 214 – 223, 2007.
- RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1 / Th2 / Th3 paradigm. **Seminars Immunology**, v.13, p.219-227, 2001.

REMYINGTON, J. S.; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O., editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 3^a ed. Philadelphia, W. B. Saunders, p. 89 – 195, 1990.

REMYINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 5^a ed. W. B. Saunders Company, Palo Alto, p. 205 – 320, 2001.

REMYINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O., editors. **Infectious Diseases of the Fetus; Newborn Infant**. 5^a ed. Philadelphia, W. B. Saunders, p. 205 – 346, 2001.

RESENDE, M. G.; FUX, B.; CAETANO, B. C.; MENDES, E. A.; SILVA, N. M.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T. The role of MHC h2^d/h2^b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v 80, p. 85 – 99, 2008.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 458 – 472, 2006.

SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 50, p. 50 – 53, 2004a.

SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13 – 17, 2004b.

SENEGAS, A.; VILLARD, O.; NEUVILE, A.; MARCELLIN, L.; PFAFF, A. W.; STEINMETZ, T.; MOUSLI, M.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon- γ -induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofetal interface. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 481 – 487, 2009.

SHIONO, Y.; MUN, H. S.; HE, N.; NAKAZAKI, Y.; FANF, H.; FURUYA, M.; AOSAI, F.; YANO, A. Maternal-fetal transmission of *T. gondii* in IFN- γ deficient pregnant mice. **Parasitology International**, v. 56, p. 141 – 148, 2007.

SHIRAHATA, T.; MUROYA, N.; OHTA, C.; GOTO, H.; NAKANE, A. Correlation between increased susceptibility to primary *Toxoplasma gondii* infection and depressed production of gamma interferon in pregnant mice. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 81 – 91, 1992.

SHIRAHATA, T.; MUROYA, N.; OHTA, C.; GOTO, H.; NAKANE, A. Enhancement by recombinant human interleukin 2 of host resistance to *Toxoplasma gondii* infection in pregnant mice. **Microbiology and Immunology**, v. 137, p. 583-590, 1993.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 82 – 85, 1992.

SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C. M.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: The role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 65 – 72, 2009.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, article in press, 2010.

SOUSA, O. E.; SAENZ, R. E.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in Panama: A 10-year study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, p. 315 – 322, 1988.

SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; CAMILO-COURA, L. Estudo Prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 1 – 14, 2003.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 1217 – 1258, 2000.

UNNO, A.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Up-regulation of hyaluron receptors in *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, p. 477 – 480, 2010.

VARAYOUD, J.; RAMOS, J. G.; BOSQUIAZZO, V. L.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. **Reproduction**, v. 127, p. 379 – 387, 2004.

ZENCLUSSEN, A. C.; JOACHIM, R.; HAGEN, E.; PEISER, C.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, p. 560 – 569, 2002.

9. ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº078/08 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 054/08

Projeto Pesquisa: "Papel das células T reguladoras e TH17 na interface materno-fetal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*".

Pesquisador Responsável: Neide Maria da Silva

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

OBS.:

- O CEUA solicita aos pesquisadores, como compensação pelo uso dos animais, bem como, como colaboração com o avanço do conhecimento ético nos CEUAS, que enviem uma carta dizendo como imagina um meio ou combinação de meios de pesquisa que não envolvessem a contaminação intencional e o sacrifício de animais, e por hipótese, servissem ainda para estudar assunto deste protocolo. O atendimento desta solicitação é opcional.

Uberlândia, 31 de outubro de 2008.

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