

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Apoptose e proliferação celular em células trofoblásticas
(linhagem BeWo) são diferentemente moduladas pelas
cepas de *Toxoplasma gondii***

MARIANA BODINI ANGELONI

UBERLÂNDIA – MG

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Apoptose e proliferação celular em células trofoblásticas
(linhagem BeWo) são diferentemente moduladas pelas
cepas de *Toxoplasma gondii***

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.

MARIANA BODINI ANGELONI

ORIENTADORA: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia – MG

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A584a Angeloni, Mariana Bodini, 1984-

Apoptose e proliferação celular em células trofoblásticas (linhagem BeWo) estão relacionadas ao tipo de cepa nos estágios iniciais da infecção por *Toxoplasma gondii* / Mariana Bodini Angeloni. - 2009.

80 f. : il.

Orientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro.

Co-orientador: José Roberto Mineo.

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

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

CDU:

616.993.1

Um dia você aprende...

...que o importante não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida...

...a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno amanhã é incerto demais para os planos e o futuro tem o costume de cair em vão...

...que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto...

...que não importa onde já chegou, mas onde está indo, pois se você não sabe para onde está indo qualquer lugar serve...

...que deve aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança...

...que o tempo não é algo que se possa voltar atrás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores...

...que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais...

...E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.

(William Shakespeare)

Dedicatória

Aos meus pais, Edson e Silvia,
por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente. Muito obrigada pelo amor incondicional e por todos os esforços e concessões que fizeram para que eu chegasse até aqui. Vocês são meus exemplos de vida!

Ao meu irmão Edson, amor da minha vida,
pelo companheirismo, por ser meu amigo e por estar ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida. Obrigada pelos momentos de alegria, sem você minha vida seria muito triste!

Ao meu namorado Wagner,
pelo amor, companheirismo, paciência e cumplicidade nos momentos de dificuldade. Obrigada por ser tão especial, por trazer luz a minha vida e me fazer muito mais feliz!

Amo muito vocês!

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro por todo apoio e toda ajuda durante esse período! Agradeço também pela idéia deste trabalho e por estar presente em todos os momentos que precisei!

Muito obrigada por sempre se preocupar comigo, pela motivação, atenção, pelo respeito, pelos incontestáveis ensinamentos e pela amizade.

Te agradeço imensamente, você foi muito importante durante esta etapa da minha vida!

Agradeço ao professor Dr. José Roberto Mineo, por me co-orientar, pela receptividade no Laboratório de Imunologia e pela atenção. Muito obrigada pelas idéias e sugestões no meu exame de qualificação, foram muito importantes para este trabalho. Tenho uma admiração imensa por suas aulas.

Agradeço a professora Dra. Neide Maria Silva pela sua importante colaboração na execução deste trabalho. Muito obrigada pelo interesse e atenção, pode ter certeza que suas contribuições foram valiosas para execução e conclusão deste trabalho.

Agradeço a professora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva pela enorme boa vontade em me ajudar sempre que precisei, pelos auxílios na bancada, pela atenção e por toda ajuda no tempo em que trabalhei na cultura de células. Muito obrigada pela liberdade que me deu e pelos ensinamentos.

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora Desatadora dos Nós, por sempre me iluminar, me ajudar a seguir em frente e, principalmente, por colocar na minha vida uma família tão maravilhosa.

A Andressa, pela imensa ajuda durante a execução deste trabalho, inclusive nos feriados e finais de semana, por toda a amizade e carinho. Você é uma pessoa muito especial. Muito obrigada por tudo, pode ter certeza de que sem você tudo teria sido muito mais difícil!

A Bellisa, por ter me ensinado a trabalhar com cultura de células. Obrigada por estar sempre disposta a me ensinar e pela amizade.

As amigas Angelica e a Idessânia pelo carinho e pela amizade. Muito obrigada pelo importante apoio de vocês e pelos momentos de descontração e alegria!

Aos amigos da histologia: Diego, Estér, Juliana, Lorena, Loyane, Priscila e Rosiane, pelos bons momentos e pela agradável convivência do dia-a-dia.

Aos funcionários da histologia: a secretária Juscélia, pela atenção, preocupação e pelo carinho, e aos técnicos, Marcelo, Fabrício e Rui, por todo o apoio e carinho de vocês. Muito obrigada pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários e colegas da Imunologia: Ana Cláudia, Celene, Dona Zilda e Márley, por contribuírem sempre que precisei, pela ajuda na cultura, pelos

parasitos, pelos reagentes e pela limpeza dos materiais que facilitaram muito o trabalho no laboratório. Muito obrigada pela atenção, carinho e ajuda. Em especial ao Damaso e ao Leandro que sempre estiveram dispostos a me ajudar e ajudaram muito!

As secretárias da Pós Graduação, Lucileide e Lucélia: pela enorme atenção e boa vontade de resolver meus problemas. Muito obrigada pela forma carinhosa que sempre me trataram.

A Karine Rezende por ter me cedido taquizoítas da cepa ME49 de *T. gondii*.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Sumário

Resumo.....	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2 Interação parasito – célula hospedeira.....	15
1.3 Formas infectantes e ciclo biológico.....	16
1.4 Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.5 Resposta imune ao parasito.....	20
1.6 Toxoplasmose.....	21
1.6.1 Toxoplasmose congênita.....	23
1.6.2 Infecção por <i>T. gondii</i> durante a gestação.....	24
1.7 Placenta Humana.....	26
1.7.1 Células de coriocarcinoma humano (Linhagem BeWo).....	28
1.8 Apoptose.....	29
1.8.1 Apoptose em células trofoblásticas.....	33
1.8.2 Apoptose e infecção por <i>T. gondii</i>	34
2. Justificativa.....	38
3. Objetivos.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. Materiais e Métodos.....	40
4.1 Cultura de células BeWo e HeLa.....	40
4.2 Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i>	40
4.2.1 Manutenção <i>in vivo</i>	40
4.2.2 Manutenção <i>in vitro</i>	41
4.3 Manutenção da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	41
4.4 Experimento para análise de apoptose e proliferação celular em células BeWo e HeLa infectadas ou não por <i>T. gondii</i>	42

4.4.1 Imunohistoquímica para detecção de apoptose utilizando anticorpo monoclonal M30.....	42
4.4.2 Análise da incidência de apoptose.....	43
4.4.3 Imunohistoquímica para detecção de proliferação celular utilizando anticorpo NCL-PCNA.....	43
4.4.4 Análise da incidência de proliferação celular.....	44
4.5 Detecção de caspase 3 ativa por microscópio confocal.....	44
4.6 Análise estatística.....	44
5. Resultados.....	45
5.1 Cepas RH e ME49 de <i>T. gondii</i> apresentaram efeitos opostos na modulação da apoptose em células BeWo e HeLa.....	45
5.2 Células BeWo e HeLa com parasitos intracelulares apresentaram menores índices de apoptose do que as células não parasitadas.....	46
5.3 Células infectadas por <i>T. gondii</i> e não infectadas apresentaram caspase 3 ativa.....	47
5.4 Células BeWo e HeLa infectadas com <i>T. gondii</i> proliferam mais do que células não infectadas.....	47
6. Discussão.....	50
7. Conclusões.....	56
8. Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU.....	57
9. Figuras.....	58
10. Referências Bibliográficas.....	65

Resumo

A transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii* causa uma das formas mais graves da infecção pelo protozoário. A habilidade do parasito em sobreviver no interior da célula hospedeira depende da capacidade do mesmo de manipular diversas vias intracelulares, entre elas, a apoptose e a proliferação celular. *T. gondii* é capaz de bloquear a apoptose da célula hospedeira através da interação com vias de sinalização anti-apoptótica da célula. Entretanto a desregulação na incidência de apoptose, durante a gestação, está associada com alterações na morfologia e nos processos fisiológicos da placenta. Dessa forma, realizou-se reações imunohistoquímica para analisar a incidência de apoptose e proliferação celular em células trofoblásticas (linhagem BeWo) infectadas com a cepa de alta virulência RH e de baixa virulência ME49, de *T. gondii*. Analisou-se também em células infectadas e não infectadas a presença de caspase 3 ativa. Células infectadas com a cepa RH apresentaram índices de apoptose menores do que o controle, enquanto que, em células infectadas com a cepa ME49 o índice de apoptose foi maior do que o observado em células não infectadas. Além disso, detectou-se caspase 3 ativa tanto em células infectadas com ambas as cepas, quanto nas não infectadas, nos três tempos de infecção analisados. Os índices de proliferação celular foram maiores em células infectadas com a cepa ME49 do que os observados no controle e em células infectadas com a cepa RH. Esses resultados sugerem que cepas de alta virulência, como a RH, possuem possível mecanismo de retardar ou inibir a apoptose, como uma estratégia de evasão e de manutenção do interior da célula hospedeira. Ao contrário, células infectadas com a cepa de baixa virulência ME49 apresentaram maiores índices de apoptose indicando que essa cepa apresenta um papel oposto na interferência do processo apoptótico da célula hospedeira, e atua induzindo a morte celular, o que pode estar associado com um possível mecanismo atenuador da infecção. Dessa forma, nós concluímos que as cepas RH e ME49 possuem comportamentos opostos na incidência de apoptose e proliferação celular de células trofoblásticas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, células trofoblásticas, proliferação celular, apoptose.

Abstract

Transplacental transmission causes one of the most severe forms of infection with protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. The ability of the parasite to survive intracellularly largely depends on the blocking of different proapoptotic signaling cascade of its host cell. However, alterations in the incidence of apoptosis, during pregnancy, are associated with abnormal placental morphology and function. Thus, were analyzed the incidence of apoptosis and cell proliferation in trophoblastic cell (BeWo line) infected with a high virulent RH and low virulent ME49 strains of *T. gondii*. For this, immunohistochemistry to determine the apoptosis and cell proliferation index was done. Besides that, was detected active caspase 3 in infected and non-infected cells. Cells infected with RH strain showed an apoptosis index lower than the control, whereas cells infected with ME49 strain this index was higher than non-infected cells. Moreover, were detected active caspase 3 in cells infected with both RH and ME49 strain and in non-infected cell, in all analyzed times of infection. Besides that, the cell proliferation indexes were higher in cells infected with ME49 strain than the index observed in control and RH strain-infected cells. These results suggest that the high virulent strain RH of *T. gondii* demonstrated a possible mechanism of delay or inhibits the apoptotic process, as an evasion strategy and a mechanism of the parasite to maintenance in the host cell. In contrast, cells infected with ME49 strain presented higher apoptosis index, indicating that this strain have an opposite mechanism and induces apoptosis of the host cell, which can be associated with a protector mechanism of this low virulent strain of *T. gondii*. So, we concluded that RH and ME49 strain have opposing behaviors in the incidence of apoptosis and cellular proliferation in trophoblastic cells.

Key-words: *Toxoplasma gondii*, trophoblast cell, cell proliferation, apoptosis.

1. Introdução

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita que pertence ao filo Apicomplexa, parasito intracelular obrigatório capaz de infectar amplo espectro de hospedeiros, que incluem todos os animais de sangue quente e alguns invertebrados (DUBEY, 2004). *T. gondii* foi descrito no mesmo ano em dois países diferentes. Splendore (1908) descreveu a espécie em coelhos, no Instituto Biológico de São Paulo, no Brasil e Nicolle & Manceaux (1908) no roedor africano *Ctenodactylus gundi*, no Instituto de Pasteur, na Tunísia (NEVES, 2005).

T. gondii possui estrutura alongada com forma curvilínea ou crescente, pode também apresentar um formato oval, indicando o início do processo de divisão celular (REY, 2001). Há presença de um núcleo, situado na região central do parasito ou mais próximo da extremidade posterior, e as demais organelas típicas de células eucariontes, além de outras típicas do parasito. O protozoário apresenta dois sistemas de membrana, uma externa simples e uma interna dupla formada pelo acoplamento de duas membranas unitárias. A membrana externa é contínua, enquanto a interna é fenestrada e incompleta, principalmente no pólo anterior do parasito (DUBEY et al., 1998; NEVES, 2005).

Na região anterior do parasito localiza-se o aparelho apical, que consiste em uma prega na membrana plasmática que delimita uma depressão central. Logo abaixo dessa depressão há uma organela chamada conóide, em forma de cone e composta por três anéis de microtúbulos, sendo dois na região apical propriamente dita e um situado posteriormente, conhecido como anel polar. Do anel polar parte uma rede de citoesqueleto subpelicular, composto por 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da membrana interna e se estendem em sentido à região posterior do parasito. Além de manter a forma do parasito, estas estruturas estão envolvidas com a motilidade e direcionamento de vesículas secretórias durante o mecanismo de invasão. (DUBEY et al., 1998; HU et al, 2006).

Na parede interna do conóide existem dois microtúbulos justapostos entre si que acompanham toda a extensão desta organela. Dentro desta estrutura estão as micronemas e as roptrias (LERICHE; DUBREMETEZ, 1990; NEVES, 2005). A proteólise induzida por essas organelas está intimamente associada com a invasão de *T. gondii* à célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006).

As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas e localizam-se na região apical do parasito, abaixo do complexo da membrana interna. Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfície da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; NEVES, 2005). Onze proteínas de micronemas já foram descritas (MIC1 a MIC11), sendo que as MIC-1, MIC-4 e MIC-6 possuem propriedade de adesão celular. Já a proteína MIC-2 está presente em todos os estágios invasivos do parasito e possui um importante papel no reconhecimento da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

As roptrias, em número de 4 a 10 organelas, são encontradas na região anterior do núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas (LICHE et al., 1975; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Já foram descritas vinte e nove proteínas de roptrias (ROP1 a ROP29) e elas estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira. Seu conteúdo protéico é liberado durante a invasão propriamente dita do parasito e na formação do vacúolo parasitóforo (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2007). Isso é feito através da liberação de enzimas proteolíticas, como ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração), que atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (KIM; WEISS, 2004). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo protéico no citoplasma da célula hospedeira e atuam na formação do vacúolo parasitóforo ficando associadas a ele, garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo, além de atuarem no recrutamento de mitocôndrias (CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008). A primeira proteína liberada pelas roptrias a ser identificada foi a ROP-2, que é uma proteína transmembrânica do vacúolo parasitóforo e fica exposta no citoplasma da célula hospedeira. A ROP-2 possui importante função, já que é ela quem faz a associação da mitocôndria da célula hospedeira ao vacúolo parasitóforo (HAJJ et al., 2006). Além disso, as roptrias estão associadas com a virulência de *T. gondii*. Recentemente, demonstrou-se que a ROP18 é proteína determinante nas cepas de alta virulência (BRADLEY; SIBLEY, 2007).

Além das roptrias e micronemas, há no citoplasma destes parasitos estruturas envoltas por membranas de conteúdo elétron-denso. Tais estruturas denominam-se grânulos densos e contém uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (GRA1 a GRA10). Uma das funções destes grânulos é a liberação de glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, possibilitando ao parasito se evadir das respostas imunes da célula hospedeira (CORTEZ et al., 2005; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

1.2 Interação parasito - célula hospedeira

T. gondii, assim como outros parasitos do filo Apicomplexa, invade a célula alvo por meio de mecanismo ativo, diferentemente da forma de invasão da maioria dos microorganismos intracelulares. Vírus e bactérias intracelulares necessitam da participação da célula hospedeira através de vias endocíticas ou fagocíticas. Ao contrário, *T. gondii* penetra ativamente na célula do hospedeiro por um processo dependente de actina e miosina do parasito (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

O processo de invasão é rápido e leva cerca de 5-30 segundos e inicia-se com o reconhecimento do parasito à célula alvo. Em seguida, há adesão da região apical do parasito à membrana plasmática da célula hospedeira, por meio de proteínas adesivas secretadas pelas micronemas. Após a adesão, as roptrias iniciam a liberação de enzimas proteolíticas que auxiliam o parasito na invasão propriamente dita da célula hospedeira (SIBLEY, 2004; SINAI, 2008).

A penetração celular de *T. gondii* se dá através de um processo de motilidade denominado “gliding”, que consiste de movimentos espiralares do parasito e independem da maquinaria da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006). Esse processo é dependente da polimerização dos filamentos de actina e é intensificado por moléculas de miosina. Assim, os componentes do citoesqueleto do parasito possuem importância fundamental na motilidade de *T. gondii* (BARRAGAN; HITZIGER, 2007).

O processo de invasão resulta no estabelecimento do vacúolo parasitóforo, que é formado pela membrana plasmática da célula hospedeira. Após a invasão, proteínas dos grânulos densos (GRA) são liberadas para o interior do vacúolo e constituem a base das vias secretoras (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; SINAI, 2008). O vacúolo parasitóforo é uma estrutura de proteção contra a fusão de vesículas endocíticas e lisossomais. Além disso, as proteínas do vacúolo garantem a aquisição de nutrientes e o recrutamento das organelas do hospedeiro, como mitocôndria e retículo endoplasmático (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

Estudos realizados em culturas de células infectadas por *T. gondii* demonstraram que, durante a proliferação do parasito e o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo há alterações na distribuição de elementos do citoesqueleto da célula hospedeira (LI et al., 2006). Além dessas alterações, *T. gondii* interfere em diversos mecanismos da célula

hospedeira, como a regulação da glicólise, metabolismo de lipídeos e colesterol, regulação do ciclo celular e apoptose (LÜDER et al., 2008).

1.3 Formas Infectantes e Ciclo Biológico

Toxoplasma gondii possui três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas apresentam-se na forma oval ou crescente, possuem uma das extremidades mais afilada e a outra arredondada. Os taquizoítas medem cerca de 2 – 4µm de largura e 4 – 8µm de comprimento e apresentam um núcleo em posição central (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; NEVES, 2005). Taquizoíta é a forma de multiplicação rápida do parasito, pelo processo de endodiogenia (Neves, 2005). Desta forma, os taquizoítas constituem a forma invasiva de *T. gondii*, responsável pelas manifestações da fase aguda da infecção. Nesta fase da infecção ocorre parasitemia, podendo causar as manifestações clínicas da toxoplasmose. Na fase aguda da doença é possível encontrar taquizoítas no sangue, linfa, exsudatos e secreções, bem como em diversos tipos celulares do organismo do homem e de animais (FARHAT et al., 1998; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítas são morfologicamente idênticos aos taquizoítas, porém, possuem multiplicação lenta e expressam algumas moléculas estágio – específicas, como BAG-1, CST-I e LDH2. Os bradizoítas ficam protegidos dentro de cistos e por isso são mais resistentes à pepsina, tripsina e ao sistema imunológico. Além disso, os bradizoítas possuem vacúolos citoplasmáticos que provavelmente armazenam carboidrato (amilopectina), que é importante na fase de latência. O núcleo dos bradizoítas é situado na região posterior, diferentemente dos taquizoítas que possuem núcleo na região central. (MCLEOD et al., 1991; DUBEY, 2004; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; EATON et al., 2006). Essa forma de *T. gondii* é encontrada no interior de cistos que são formados nos tecidos do hospedeiro. Esses cistos possuem tamanho variado, que vai de 5 a 70µm e podem conter de centenas a milhares de bradizoítas em seu interior (DUBEY, 2004). Além disso, os cistos teciduais são geralmente encontrados na fase crônica da toxoplasmose também chamada de período de latência da infecção (NEVES, 2005).

Os cistos podem permanecer nos tecidos por toda a vida do hospedeiro. Caso haja uma imunossupressão, há conversão de estágio de bradizoítas para taquizoítas, que voltam a se multiplicar rapidamente, são liberados e há disseminação do parasito no organismo sob a forma de taquizoítas (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

Os oocistos são esféricos, medem cerca de 10-12µm e possuem uma parede dupla muito resistente ao meio ambiente. A liberação desses oocistos, pelas fezes dos felídeos, ocorre em um período de 7 a 21 dias após a ingestão de parasitos, e quando liberados estão imaturos. Após a esporulação, que ocorre no meio ambiente em cerca de 1 – 5 dias após serem liberados, os oocistos passam a conter em seu interior dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada, tornando-se infectantes (NEVES, 2002; DUBEY, 2004).

Oocistos podem permanecer infectantes por mais de um ano após a esporulação, se estiverem em ambiente adequado, ou seja, locais úmidos e com altas temperaturas, em torno de 37°C (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Infecções em mamíferos aquáticos indicam que os oocistos são capazes de sobreviver também em águas marinhas (HILL; DUBEY, 2002).

O ciclo biológico de *T. gondii* se processa em duas fases distintas: assexuada e sexuada. Os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos porque apresentam a fase coccidiana do ciclo, na qual ocorre uma etapa assexuada (merogonia) e uma sexuada (gamogonia). Já os outros animais, como mamíferos e aves, possuem apenas o ciclo assexuado do parasito e são considerados hospedeiros intermediários de *T. gondii* (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004; NEVES, 2005).

Os felídeos podem se contaminar ao ingerir cistos teciduais contendo bradizoítas, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início à fase enteroepitelial do ciclo, que ocorre em células epiteliais do intestino delgado desses animais (NEVES, 2005). Esses são os únicos animais capazes de eliminar oocisto de *T. gondii* nas fezes. Essa eliminação ocorre de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais, 18 dias após ingestão de oocistos e 13 dias após ingestão de taquizoítas. Quando há ingestão de taquizoítas ou oocistos cerca de 30% dos gatos passam a eliminar oocistos, no entanto, aproximadamente 100% passam a eliminar oocistos após ingerirem cistos teciduais (DUBEY et al., 1998).

O ciclo induzido pela ingestão de bradizoítas é o melhor conhecido. Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, inicia-se a fase coccidiana do ciclo. A parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago desses animais, promovendo a liberação de bradizoítas que penetram nas células do estômago e do intestino. Nas células epiteliais do intestino, há o início da etapa assexuada do ciclo, na qual os parasitos começam a se multiplicar por meio do processo de endodíogenia (merogonia). Há então a formação de merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, esse conjunto recebe o nome de esquizonte maduro (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004).

A etapa sexuada do ciclo coccidiano se inicia quando ocorre o rompimento da célula infectada com conseqüente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras células epiteliais e se transformam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta, presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa envolta do zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto com as fezes dos felídeos (DUBEY, 2004; NEVES, 2005).

A maturação do oocisto ocorre no meio externo em um período de 1 a 5 dias após a eliminação. Essa maturação ocorre através de um processo denominado esporogonia, que dá origem a esporozoítos no interior dos oocistos, tornando-os infectantes aos hospedeiros (REY, 2001; NEVES, 2005).

Os hospedeiros intermediários como o homem, por exemplo, podem adquirir a infecção por diferentes maneiras. Através da ingestão de oocistos, que presentes no solo podem contaminar água e alimentos; ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas; ingestão de taquizoítas que podem estar presentes em líquidos biológicos (saliva, leite, esperma); transplantes de órgãos e infecções transplacentárias (FERREIRA; ÁVILA, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Uma vez que o hospedeiro intermediário entra em contato com uma das formas infectantes de *T. gondii*, o parasito sofre intensa multiplicação e penetra em vários tipos celulares do organismo hospedeiro, local onde o parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica por endodiogenia formando novos taquizoítas. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células, essa fase proliferativa de taquizoítas é chamada de fase aguda da toxoplasmose. Através de mecanismos imunológicos do hospedeiro, ocorre diminuição da quantidade de parasitos circulantes no organismo e alguns taquizoítas evoluem para bradizoítas com a formação de cistos, característicos da fase crônica da doença. Se não houver nenhum distúrbio no sistema imunológico, essa fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; NEVES, 2005).

1.4 Cepas de *Toxoplasma gondii*

Já foram descritas duas classes clonais de cepas, aquelas dominantes que possuem o genótipo identificado e que diferem em 1% de seus genes, e as exóticas, cujos genótipos diferem daquelas já identificadas (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; VILLENA et al., 2004).

Na classe clonal das cepas dominantes encontram-se três tipos clonais: I, II e III. As do tipo I (RH, CAST e VEL) são virulentas em camundongos e podem causar morte desses animais, pois o sistema imune não é capaz de controlar a disseminação de parasitos e desencadeia potente resposta inflamatória (APPLEFORD; SMITH, 2000). Em humanos, as cepas do tipo I estão associadas às manifestações clínicas graves da toxoplasmose, incluindo manifestações oculares atípicas (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; SAEIJ et al., 2005).

As cepas do tipo II (ME49, PDS e PLK) e tipo III (CEP e VEG) são de baixa virulência em camundongos e a infecção por essas cepas tendem a cronicar (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Em seres humanos as cepas do tipo II são mais comuns nos casos de toxoplasmose congênita e em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (AJZENBERG et al., 2005). **Khan et al., 2005**

A resposta imunológica influencia na virulência das cepas e na patogenia da infecção. Estudos demonstraram que o inóculo de apenas um taquizoíta da cepa RH (tipo I) é suficiente para gerar alta carga parasitária e altos níveis de citocinas Th1, que aumentam a apoptose e os danos aos órgãos do hospedeiro. Enquanto, são necessários sucessivos inóculos com elevadas cargas parasitárias de cepas do tipo II, para que ocorra resposta imune semelhante à observada em cepas de alta virulência (SAEIJ et al., 2005).

Análises genéticas detalhadas evidenciam que a variação gênica dentro de cada genótipo de *T. gondii* é extremamente rara (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Entretanto, há um aumento no número de cepas descobertas que não pertencem a estes três genótipos. Essas cepas são denominadas recombinantes ou exóticas pelo fato de seus genótipos serem diferentes ou por representar uma mistura dos três genótipos existentes. Estudo recente demonstrou uma abundância de cepas recombinantes em pacientes com retinocoroidite no Brasil (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; PETERSEN, 2007). As cepas exóticas ou atípicas também estão associadas às manifestações clínicas graves da toxoplasmose e são frequentemente observadas em países como a África e o Brasil, devido à diversidade de hospedeiros intermediários e definitivos de *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2005).

1.5 Resposta imune ao parasito

A resposta imune à infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Essa variação individual pode ser explicada pelo alto grau de diversidade genética do hospedeiro. Além disso, *T. gondii* é capaz de infectar praticamente todos os tecidos, e cada compartimento apresenta uma resposta imunológica específica, principalmente no sistema nervoso central e na placenta (FILISETTI; CANDOLFI, 2004).

Como *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra o patógeno é mediado pela resposta imune celular. Fazem parte dessa resposta as células apresentadoras de antígeno (células desdríticas e macrófagos), linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e células “natural Killer” (NK). (FILISETTI; CANDOLFI, 2004). Os anticorpos apresentam papel secundário como mecanismo protetor, mas são importantes para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose (KANG et al., 2000).

Recentemente, detectou-se outro mecanismo de resistência do hospedeiro a *T. gondii*, que envolve a participação de receptores do tipo Toll (“Toll-like receptor” – TLR). Estudos demonstraram que camundongos deficientes para o gene que codifica MyD88 (“Mieloyd Differentiation factor 88”), uma molécula adaptadora essencial para TLR, falharam no controle da infecção aguda e observou-se aumento significativo da carga parasitária nesses animais (YAROVINSKY; SHER, 2006; YAROVINSKY, 2008).

O parasito é capaz de ativar macrófagos e células NK, que constituem a primeira linha de defesa nos estágios iniciais da infecção. Essa ativação tem como função limitar a proliferação, devido a ações citotóxicas direta e indireta, além de iniciar resposta imune específica por meio da apresentação de antígenos (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; YAP et al., 2006). Estudos demonstraram que na ausência de células TCD4⁺, as células NK desempenham um papel essencial na indução de imunidade mediada por células TCD8⁺ contra *T. gondii*. A depleção de células NK, em animais deficientes para TCD4, diminuiu a resposta imune mediada pelas células TCD8⁺ contra o parasito e os animais se tornaram mais susceptíveis à infecção (COMBE et al., 2005).

As células efetoras envolvidas na resistência do hospedeiro ao parasito exercem suas funções por meio de atividade citotóxica e secreção de citocinas que regulam a resposta imune (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

Os linfócitos TCD8⁺ são essenciais na resistência durante a fase ativa da infecção e desempenham a principal função efetora contra *T. gondii*, uma vez que exercem atividade citotóxica contra taquizoítas ou células infectadas pelo parasito (GAZZINELLI et al.,

1991; COMBE et al., 2005). Já os linfócitos TCD4⁺ atuam regulando a resposta imune contra o hospedeiro e auxiliam na manutenção da resposta de TCD8⁺ (COMBE et al., 2005).

Os linfócitos TCD4⁺ são divididos em duas sub-populações: Th1 e Th2. Essa distinção é baseada no tipo de citocina que os linfócitos secretam após serem estimulados. As células do tipo I produzem principalmente Interferon- γ (IFN- γ) e Interleucina-12 (IL-12), que atuam na resistência à infecção. Já as células do tipo II produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que são citocinas de perfil anti-inflamatório (SUZUKI et al., 1998; FILISETTI; CANDOLFI, 2004). A resposta imune contra a infecção por *T. gondii* é mediada por células Th1.

Dentre as principais funções de IFN- γ estão a ativação de macrófagos e células NK, indução de MHC de classe II e inibição da resposta Th2. Estudos demonstraram que em camundongos, IFN- γ aumenta a atividade fagocítica de macrófagos e é responsável pelo início da conversão de taquizoítas em bradizoítas (FILISETTI; CANDOLFI, 2004).

A resposta imune humoral possui um papel menor no controle da infecção. Entretanto, os anticorpos são parâmetros importantes para as técnicas de diagnóstico. As classes de anticorpos IgM são as primeiras a aparecer após a infecção por *T. gondii* e são característicos de fase aguda ou infecção recente, no entanto, podem permanecer detectáveis no soro humano por anos (GROSS et al., 2004; REMINGTON et al., 2004). Anticorpos IgG correspondem à segunda classe de imunoglobulinas detectadas na toxoplasmose. A detecção desses anticorpos pode indicar que a infecção está na fase crônica, já que esses anticorpos atingem titulação máxima em cerca de 6 semanas e permanecem com baixos títulos por toda a vida do hospedeiro (FERRO, 2000; SUKTHANA, 2006).

1.6 Toxoplasmose

A toxoplasmose é a zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Essa protozoose, ao contrário de outras doenças causadas por parasitos, não é restrita às regiões tropicais e subtropicais. A toxoplasmose possui ampla distribuição geográfica e estima-se que aproximadamente 25% da população mundial apresenta-se infectada por *T. gondii* (SPALDING et al., 2003; FERREIRA et al., 2004).

Os altos índices de infecção da população fazem com que a doença seja uma ameaça à saúde humana. No Brasil, pesquisas sorológicas revelam que 40-80% da

população é positiva para *T. gondii* (NEVES, 2005). Em algumas áreas brasileiras, aproximadamente 60% das crianças, entre 6 e 8 anos, possuem anticorpos contra o parasito (HILL; DUBEY, 2002). Já na Europa a soroprevalência de *T. gondii* é maior que 54% (PETERSEN, 2007).

A prevalência de pessoas infectadas com a doença está relacionada com diversos fatores que variam de uma região para outra. Dentre os fatores estão as condições ambientais, o desenvolvimento da região e os hábitos higiênicos e alimentares da população (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; KLEIN, 2001). Na França, por exemplo, a prevalência de *T. gondii* é alta, cerca de 80% da população, já que os franceses possuem o hábito de comer carne mal cozida (REMINGTON; KLEIN, 2001). Nos países tropicais a prevalência da infecção também é alta, pois o clima favorece a esporulação e a sobrevivência de oocistos no meio ambiente (JONES et al., 2001).

A infecção possui duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda há predomínio de taquizoítas que por meio, principalmente de monócitos, disseminam-se pelo sangue do hospedeiro até que haja o desenvolvimento da resposta imunológica, que ocorre após 7-10 dias de infecção (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). É nessa fase que pode ocorrer algumas manifestações clínicas como febre e linfadenopatia. Porém, na maioria dos casos, cerca de 85-90%, a doença se processa de forma assintomática (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A fase crônica estabelece-se após haver resposta imunológica, humoral e celular, contra o patógeno. Entretanto, o sistema imunológico não elimina completamente a infecção, levando ao aparecimento de cistos teciduais que podem permanecer por toda a vida do hospedeiro (FERREIRA; ÁVILA, 2001; DUBEY, 2004).

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

Em indivíduos imunocompetentes, geralmente a toxoplasmose cursa de forma benigna, mas há dois casos em que a doença é potencialmente grave: nos pacientes imunocomprometidos e na transmissão congênita da doença (GROSS et al., 2004).

1.6.1 Toxoplasmose congênita

A transmissão congênita da toxoplasmose ocorre quando a mulher adquire a infecção durante o período gestacional. A toxoplasmose congênita é grave e pode causar sérios danos ao feto infectado (JONES et al., 2001).

A incidência da infecção congênita varia entre os países e está associada aos hábitos alimentares, higiênicos e sócio-culturais das mulheres. Estima-se que de cada 1000 nascimentos no mundo, 3 a 8 bebês são infectados intra-uterinamente (RORMAN et al., 2006; ELSHEIKHA, 2008). Além disso, estudos demonstraram que nos Estados Unidos, país considerado com baixa incidência de toxoplasmose congênita, a doença afeta de 500 a 5000 recém nascidos a cada ano (BOYER et al., 2005).

A prevalência de mulheres, em idade gestacional e soropositivas para *T. gondii* é de 15% nos Estados Unidos, 58% na Europa Central, 51-72% na América Latina e de 54-77% em países africanos (RORMAN et al., 2006; ELSHEIKHA, 2008).

Mulheres infectadas cronicamente, quando imunossuprimidas, também podem transmitir o parasito ao feto, resultando na forma congênita da toxoplasmose. Nesse caso, com a supressão do sistema imune há reagudização da doença e posterior infecção placentária e fetal (CHEN et al., 2005). Bachmeyer e colaboradores (2006) notificaram um caso de transmissão congênita de *T. gondii* em consequência de reativação da infecção em uma mulher que não estava severamente imunodeprimida.

Na transmissão congênita da toxoplasmose, o parasito que se encontra na forma taquizoíta, ganha a circulação fetal após haver a infecção da placenta (BACHMEYER et al., 2006). O feto, após entrar em contato com o parasito, pode apresentar manifestações clínicas com gravidade diferente dependendo da virulência da cepa de *T. gondii*, da capacidade de resposta imune materna durante a parasitemia e do período gestacional (SPALDING et al., 2003; RORMAN et al., 2006).

A probabilidade de haver infecção fetal quando a primo-infecção materna ocorre no período pré-concepção é de 1%. Quando a mulher adquire a infecção no primeiro e segundo trimestres da gestação, a chance de ocorrer transmissão da doença para o feto é de 10-20%. Enquanto, no terceiro trimestre gestacional a infecção fetal ocorre com maior frequência, em cerca de 60-90% dos casos (JONES et al., 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Entretanto, os danos causados aos fetos, em consequência da infecção, são mais graves quando a transmissão ocorre no primeiro e segundo trimestres da

gestação e mais amenos quando a infecção fetal ocorre no terceiro trimestre (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

A infecção materna aguda também pode levar a morte do feto (CHEN et al., 2005). Além disso, alguns fetos podem apresentar sinais clínicos da toxoplasmose antes do nascimento como calcificações intracraniais, dilatação ventricular e aumento hepático. Já as manifestações clínicas em neonatos podem variar e incluem: hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite, estrabismo, cegueira, retardo psicomotor e mental, trombocitopenia e anemia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A tríade clássica da toxoplasmose consiste em coriorretinite, calcificação intracranial e hidrocefalia e é observada em menos de 10% dos casos de infecção congênita (RORMAN et al., 2006).

No entanto, na maioria dos casos (70 – 90%) os recém nascidos são assintomáticos para a doença e podem desenvolver lesões na segunda ou terceira décadas de vida, sendo que 80% das crianças que nascem com toxoplasmose congênita desenvolvem problemas de aprendizagem ou visuais na vida adulta (Jones et al., 2003; Rorman et al., 2006). Estudos realizados por Vutova e colaboradores (2002) demonstraram que a manifestação clínica ocular mais frequente (92% dos casos) na toxoplasmose congênita é a coriorretinite.

A educação da população e, principalmente, das mulheres sobre a doença e as formas de prevenção, diminui significativamente a incidência da toxoplasmose congênita (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; ELSHEIKHA, 2008).

1.6.2 Infecção por *T. gondii* durante a gestação

Durante a gestação, há diversas alterações no organismo materno que podem estar associadas ao aumento na susceptibilidade à infecção (YAP et al., 2006). Uma dessas alterações está relacionada ao aumento de hormônios, principalmente progesterona e estrógeno. Essa condição implica em alterações no balanço do perfil de citocinas Th1/Th2 (ROBERTS et al., 2001). Dessa forma, durante o processo gestacional o perfil de resposta imune na placenta é do tipo 2, caracterizado pela expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-10 (LUPPI, 2003). Essa imunomodulação, durante a gestação, está representada na **figura 1** (CUTOLO et al., 1998). Essas alterações são necessárias para que haja tolerância materna aos aloantígenos paternos. Além disso, as citocinas estão associadas com a manutenção do corpo lúteo, adesão e implantação do blastocisto ao endométrio e desenvolvimento placentário e fetal (LUPPI, 2003; ABOU-BACAR et al., 2004). O estabelecimento de uma gestação é, portanto, caracterizado por predominância de

citocinas anti-inflamatórias, que garantem o sucesso gestacional (Bowen et al., 2002). Entretanto, durante a gestação, citocinas pró-inflamatórias são pouco expressas, o que favorece a transmissão placentária de *T. gondii*, já que essas são importantes no controle da infecção (Prigione et al., 2006).

Uma das citocinas de tipo 2 mais importante nesses processos é a IL-10. Camundongos deficientes em IL-10 são altamente susceptíveis à infecção e incapazes de controlá-la, apresentando um processo inflamatório intenso no intestino e fígado, provavelmente pela produção sem controle de IL-12, IFN- γ e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (YAP et al., 2006).

Outra citocina importante durante o processo de gestação é IFN- γ , que apresenta uma função interessante na interface materno-fetal. Estudos demonstraram que em camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com IFN- γ houve grande proteção exercida por esta citocina (MCCABE et al., 1985; SUZUKI et al., 1988). Entretanto, quando efetua-se o bloqueio de IFN- γ em camundongos na fase aguda da infecção, ocorre diminuição da infecção placentária e fetal dos animais (ABOU-BACAR et al., 2004). Células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) são incapazes de controlar a infecção pelo parasito mesmo após o tratamento com IFN- γ (OLIVEIRA et al., 2005; BARBOSA et al., 2008).

Dessa forma, alterações nos níveis hormonais e no padrão de citocinas na interface materno-fetal apresentam importante papel na patogênese da infecção em neonatos através do aumento da passagem transplacentária do parasito (PRIGIONE et al., 2006).

As células T regulatórias (Tregs) também atuam no controle de células Th1. O nível dessas células durante a gestação é aumentado em 100% quando comparado com o de não gestantes e, após o nascimento, essas células retornam aos níveis basais. Entretanto, células Treg não influenciam na expressão de IL-4 e IL-10, indicando a participação de outros mecanismos de proteção (SOMERSET et al., 2004; ZENCLUSSEN, 2006).

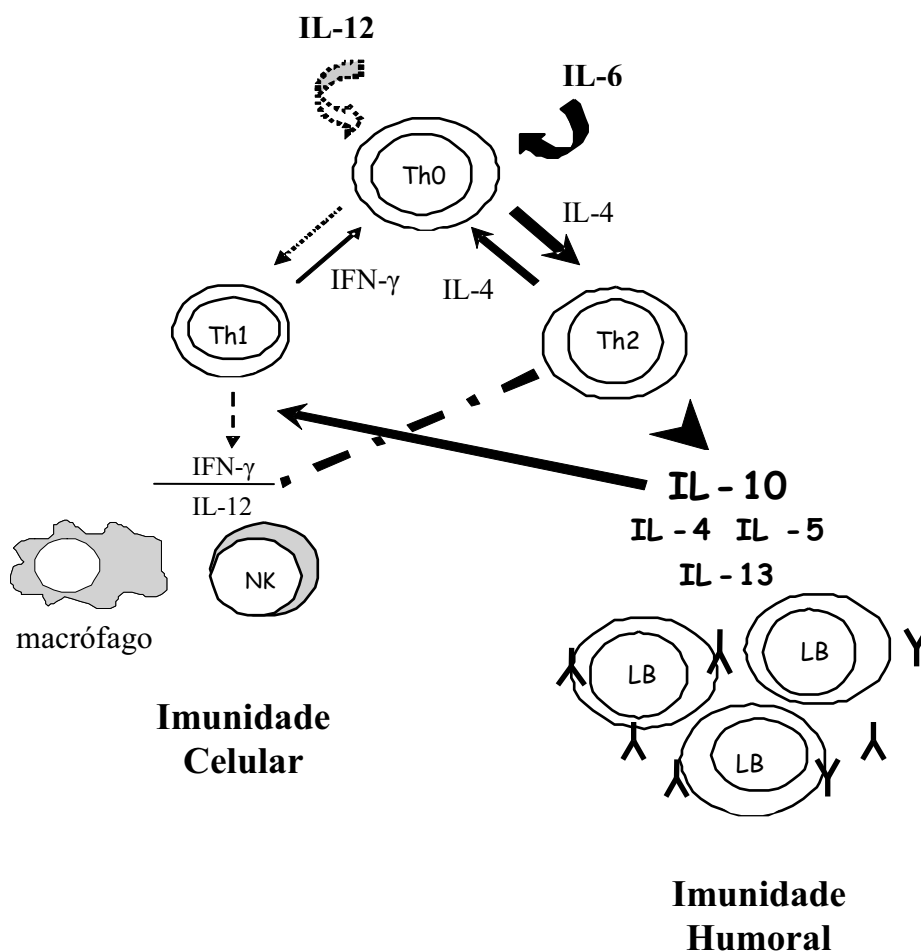


Figura 1. Prevalência de citocinas Th2 durante a gestação com conseqüente predomínio de uma imunidade humoral. IL-4, IL-5, IL-13 e principalmente IL-10 apresentam-se no sangue, baço e ambiente uterino-placentário em concentrações maiores do que as citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2). IL-10 inibindo o crescimento de células Th1 mantém a resposta Th1 em níveis baixos. IFN- γ por sua vez não atinge os níveis necessários para impedir a ativação das células Th2 (modificado de CUTOLO et al., 1998).

1.7 Placenta Humana

A placenta é um órgão fundamental para o sucesso gestacional. Ela é composta por uma parte materna e uma parte fetal e é o local onde há trocas fisiológicas entre o sangue materno e o do feto. Entre as substâncias envolvidas nessas trocas estão: oxigênio, gás carbônico, água, nutrientes, anticorpos maternos, entre outras. Além da função de trocas, a placenta ainda secreta hormônios que contribuem para o sucesso da gestação (LARSEN, 1993; CARLSON, 1996). O processo de implantação de formação da placenta é um processo coordenado através da interação das células trofoblásticas e a mucosa uterina (GUDE et al., 2004).

A placenta humana é do tipo hemocorial, sendo caracterizada pela presença de sangue materno em contato direto com as células trofoblásticas (GUDE et al., 2004). O processo de formação desse tipo de placenta caracteriza-se por um processo fisiológico específico, como a secreção de hormônios, citocinas e moléculas de adesão, o que torna o endométrio receptivo ao conceito. Previamente à formação da placenta, o trofoblasto, camada celular externa ao blastocisto, sofre mudanças morfofisiológicas que se iniciam com a perda da zona pelúcida. Estabelecido o contato do trofoblasto com o sangue materno, os tecidos fetais estão intimamente expostos ao sistema imunológico materno (APLIN, 2000). No entanto, o sangue fetal é contido no interior de vasos sanguíneos, não entrando em contato direto com o sangue materno. Essa situação reflete a proteção do feto contra possíveis transmissões de patógenos ou toxinas oriundos da mãe, contudo, permissivo à passagem de nutrientes, oxigênio e anticorpos maternos. Essa barreira placentária é formada por quatro camadas: sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto, tecido conjuntivo e células endoteliais dos vasos fetais (GUDE et al., 2004).

A estrutura da placenta humana inclui as porções materna e fetal constituídas pela decídua e placa coriônica, respectivamente. As células deciduais são derivadas de fibroblastos, que se diferenciam e formam a decídua. Essas células produzem uma matriz rica em laminina, colágeno IV e fibronectina, além de secretarem várias citocinas, fatores de crescimento e agentes imunomoduladores envolvidos na regulação da invasão do trofoblasto (JONES et al., 2006). A placa coriônica é formada por vilos coriônicos, que constituem a barreira placentária propriamente dita. A população de células trofoblásticas corresponde à primeira camada celular dos vilos e, conseqüentemente, é banhada pelo sangue materno, conferindo uma exposição direta dessas células ao sistema imune materno (GUDE et al., 2004).

As células trofoblásticas apresentam intensa capacidade de diferenciação e proliferação. O trofoblasto ainda apresenta diversas funções durante a gestação como: adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (FERRO, 2000). Além disso, as células trofoblásticas humanas produzem IL-10, fator de crescimento tumoral β (TGF- β), fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), TNF- α , IFNs, IL-1 e IL-6 (ENTRICAN, 2002).

O trofoblasto também apresenta características que garantem a tolerância materna e previnem a rejeição do conceito, como a não expressão de moléculas do Complexo de

Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe II e classe Ia, garantindo o não reconhecimento do conceito pelo sistema imune materno, mesmo estando em íntimo contato com o sangue da mãe (ENTRICAN, 2002).

1.7.1 Células de Coriocarcinoma Humano (Linhagem BeWo)

A linhagem de células BeWo é derivada de coriocarcinoma humano e foi isolada em 1968 por Pattillo e Gey. Essas células formam monocamadas que não se diferenciam em sincício, oferecendo uma alternativa no sistema de cultura para os mais variados estudos *in vitro* (CHURCH; APLIN, 1998).

Em cultura, esta linhagem de células gera uma matriz extracelular rica em laminina (Church; Aplin, 1998). Além disso, secretam citocinas como IL-6, IL-8, IL-4 e IL-10 (BENNETT et al., 1997; FUJISAWA et al., 2000).

Essa linhagem de células é particularmente atrativa para experimentos *in vitro*, pois é estável, relativamente de fácil manutenção e o crescimento em monocamadas ocorre em curto período (4 a 5 dias). Somando-se a isto, células BeWo apresentam propriedades morfológicas e marcadores bioquímicos comuns ao trofoblasto normal (VAN DER ENDE et al., 1990). Apesar de se encontrarem em cultura há mais de 40 anos, essa linhagem celular mantém a habilidade de secretar grandes quantidades de gonadotrofina coriônica humana (HCG) e hormônio lactogênio placentário, substâncias secretadas pela placenta humana (PATTILLO et al., 1979).

Segundo Bercowitz e colaboradores (1988) essas células também secretam TNF- α , além de expressarem seus receptores. Além disso, Entrican e colaboradores (2002) verificaram que as células BeWo não produzem IFN- γ biologicamente ativo, porém apresentam receptores para essa citocina, e também não expressam a Idoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) constitutivamente. Experimentos demonstraram que células BeWo, infectadas com *Chlamydomphila abortus*, não conseguem deter o crescimento desta bactéria mesmo após o tratamento com IFN- γ (ENTRICAN et al., 2002). Similarmente, Oliveira e colaboradores (2006) demonstraram que as células BeWo são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, mesmo após a administração exógena de IFN- γ . Estudos semelhantes foram realizados por Pfaff e colaboradores (2005) que demonstraram que mesmo na presença de IFN- γ e TNF- α , as células BeWo não conseguiram controlar a proliferação de *T. gondii*. Além disso, quando há bloqueio de IL-10 ou de TGF- β , células BeWo são capazes de controlar a infecção por *T. gondii* apenas na presença de IFN- γ exógeno, demonstrando

que a susceptibilidade dessas células ao parasito ocorre devido aos mecanismos imunomoduladores dependentes da ação coordenada de citocinas (BARBOSA et al., 2008).

Dessa forma, esta linhagem celular trofoblástica é considerada como um modelo apropriado para a realização de estudos *in vitro* que possibilitem obter maior conhecimento sobre os mecanismos moleculares normais e patológicos envolvidos na interface materno-fetal.

1.8 Apoptose

Apoptose é um processo de morte celular programada, que ocorre nos tecidos adultos e nos em desenvolvimento (SINAI et al., 2004; ALBERTS et al., 2006). Esse processo é importante, pois está associado a diversos eventos celulares, como: remoção de células danificadas ou não desejadas durante o desenvolvimento, remoção de células tumorais, homeostase tecidual, remoção de células durante o processo de envelhecimento de organismos multicelulares, além de ser um importante mecanismo da imunidade inata e adaptativa contra patógenos (HEUSSLER et al., 2001; LÜDER et al., 2001). Além disso, a apoptose é essencial para a seleção do repertório linfocitário, garantindo a deleção de linfócitos T e B autoreativos (MANIATI et al., 2008).

O processo apoptótico é caracterizado por alterações típicas que incluem: alteração na simetria da membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, clivagem do DNA, formação de estruturas conhecidas como “blebs”, desintegração celular e formação de corpos apoptóticos (HACKER, 2000; REED, 2000).

Células que morrem como resultado de uma doença aguda normalmente incham e sofrem lise, derramando todo o conteúdo intracelular sobre as células vizinhas, um processo chamado de necrose celular e que aciona uma resposta imune potentemente danosa (SINAI et al., 2004; ALBERTS et al., 2006). Em contraste, células que sofrem apoptose morrem sem que haja danos às células vizinhas, pois não há ruptura da membrana plasmática. Além disso, durante o processo há alterações na membrana da célula promovendo o recrutamento de células fagocíticas que removem os corpos apoptóticos sem que haja resposta inflamatória (ALBERTS et al., 2006).

O processo apoptótico está associado a uma família de cisteínas proteases, chamadas de caspases, que clivam o substrato no resíduo de ácido aspártico e atuam na execução da apoptose (RUPINDER et al., 2007). As caspases situam-se no citoplasma e

são produzidas como pró-enzimas, ou seja, na forma inativa, mas são ativadas após clivagem proteolítica (ARNOULT, 2006). As caspases são classificadas em dois grupos: iniciadoras (caspases 8 e 9) e caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7). As iniciadoras têm a função de iniciar o processo apoptótico através da clivagem e ativação de outras caspases, que desempenham papel de efetoras ou executoras, clivando diversos substratos levando à alterações celulares características da apoptose (OPFERMAN; KORSMEYER, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Nos vertebrados, a apoptose ocorre, principalmente, por duas vias: extrínseca e intrínseca (**Figura 2**). A via extrínseca é iniciada através da interação de receptores de membrana (conhecidos como receptores de morte) com seus ligantes específicos (HENGARTNER, 2000). Esses receptores são aqueles que fazem parte da família do fator de necrose tumoral, como TNFR e Fas (Apo1/CD59), presentes na membrana celular, (REED, 2000). Quando há ligação do receptor ao seu ligante, há formação de um complexo sinalizador de indução de morte (DISC). O DISC incorpora moléculas adaptadoras como FADD (domínio de morte associado ao Fas) que se ligam à pró-caspase iniciadora 8, através de domínios de morte. As caspases iniciadoras clivam e ativam as caspases efetoras dando início ao processo de morte celular (OPFERMAN; KORSMEYER, 2003; ELMORE, 2007).

A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada por estímulos que resultam na permeabilização da membrana externa da mitocôndria promovendo a liberação de proteínas do espaço intermembranoso desta organela (**Figura 2**). Diversas dessas proteínas iniciam ou regulam a ativação das caspases, a principal delas é o citocromo c (GREEN, 2003; OW et al., 2008). No citoplasma, o citocromo c se liga ao fator ativador de protease apoptótica - 1 (Apaf-1). O Apaf-1 é um monômero que quando ligado ao citocromo c, na presença de ATP, sofre mudanças conformacionais, formando um heptâmero. Há então a exposição de domínios de recrutamento de caspase ativada (CARD), permitindo a ligação da pró-caspase 9, formando o apoptossomo. Este consiste de uma plataforma que promove a ativação da caspase 9 que, posteriormente, ativa as caspases executoras (REED, 2000; OW et al., 2008).

A liberação do citocromo c é controlada por membros da família de proteínas típicas do linfoma de células B (Bcl-2). A presença de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W e Mcl-1) previne a apoptose inibindo a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (**Figura 2**). Essas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2

neutralizam as proteínas pró-apoptóticas que também pertencem à família Bcl-2 (Bax, Bak, Bad e Bid) e são responsáveis pela liberação do citocromo c. Alguns estímulos externos como radiação ultravioleta e aumento da proteína supressora de tumor p53, podem ativar as proteínas pró-apoptóticas, levando ao aumento na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (JAMES; GREEN, 2004; KIM et al., 2006). Além disso, a proteína Bid também pode ser ativada pela caspase 8, promovendo a interação entre as duas vias apoptóticas (TAYLOR et al., 2008).

A apoptose também pode ser controlada por proteínas inibidoras de apoptose (IAP) que, quando expressas, podem bloquear a apoptose inibindo caspases iniciadoras e efetoras (Heussler et al., 2001). A expressão dessas proteínas é regulada em nível de transcrição gênica pelo fator nuclear de transcrição kappa B (NF- κ B) (SINAI et al., 2004).

Há ainda outras vias que promovem a ativação das caspases efetoras. Por exemplo, produtos das células citotóxicas (perforina e granzima B) são capazes de ativar a proteína Bid ou caspase 3, fazendo com que a célula morra por apoptose (**Figura 2**) (GREEN, 2003).

Uma vez iniciado o processo de apoptose, a célula passa por diversas transformações que vão culminar nas alterações morfológicas características do processo. A primeira delas é a proteólise das proteínas que atuam na adesão intercelular, causando a retração da célula. Em seguida, há a proteólise dos elementos do citoesqueleto da célula, como microtúbulos, tubulina e citoqueratina. As caspases efetoras também atuam promovendo a fragmentação do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e da lâmina nuclear, que dá início a fragmentação do núcleo da célula. Além disso, as caspases efetoras clivam ICAD (inibidor de DNase ativada por caspase), formando CAD (DNase ativada por caspase) que, por sua vez, atua catalisando a clivagem do DNA, um dos eventos finais da apoptose. Todas essas alterações levam a formação dos “blebs” e, em seguida, dos corpos apoptóticos (ELMORE, 2007; TAYLOR et al., 2008). Durante o processo de apoptose há a exposição, na membrana plasmática, do fosfolípido fosfatidilserina (PS). PS fica confinada na região interna da membrana plasmática, mas é translocada para a região externa após os estímulos pró-apoptóticos, induzindo a apoptose dos corpos apoptóticos (TAYLOR et al., 2008).

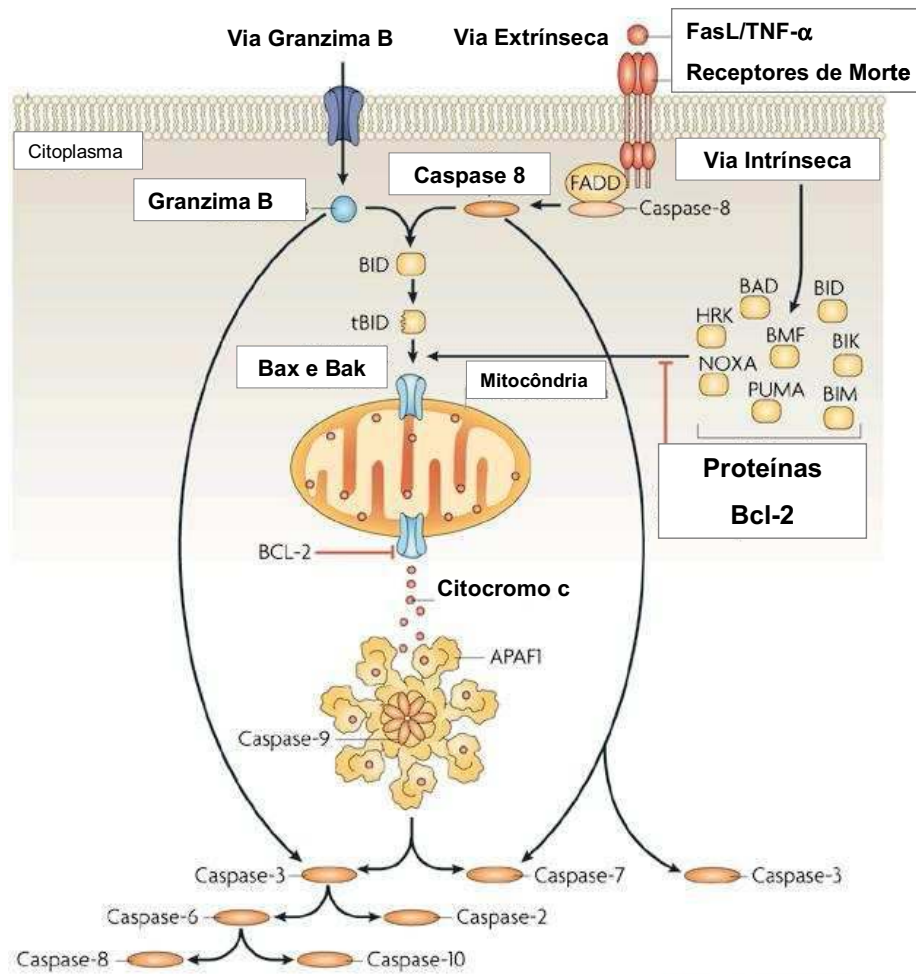


Figura 2: A apoptose pode ser iniciada, principalmente por três vias. A via extrínseca ocorre após a ligação dos receptores de morte na superfície celular com seus ligantes, a via intrínseca, que consiste na liberação do citocromo c pela mitocôndria e a via da granzima B, que ocorre após ação dos linfócitos citotóxicos. Nos três casos as alterações observadas na célula progridem para a ativação de caspases iniciadoras e executoras, que promovem a degradação dos componentes intracelulares (Retirado e adaptado de TAYLOR et al., 2008).

1.8.1 Apoptose em células trofoblásticas

A apoptose é crucial para o desenvolvimento e homeostase de tecidos humanos, incluindo a placenta (CROCKER et al., 2003). O processo apoptótico ocorre nas células trofoblásticas e tem como objetivo a renovação dessas células e indução da tolerância aos antígenos fetais durante a gestação (RANGO, 2008). Esse processo é regulado ao longo do desenvolvimento placentário, sendo que, no terceiro trimestre gestacional a incidência de apoptose é maior do que no primeiro (LEVY; NELSON, 2000).

Além disso, a apoptose nas células trofoblásticas está associada à proteção imunológica. Fas ligante (FasL), induz apoptose em células T que expressam receptor em suas membranas conhecido como Fas ou CD95 (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). O sistema Fas-FasL, que atua na regulação das funções imunes através da morte celular mediada por linfócitos T, é expresso também nos tecidos reprodutivos e, alterações na sua expressão e função, podem levar a anormalidades como o desenvolvimento de vários cânceres ginecológicos (BALDWIN et al., 1999; GUTIERREZ et al., 1999). Células BeWo, como as outras células trofoblásticas, expressam funcionalmente FasL, o que provavelmente contribui com mecanismos de evasão de ações do sistema imune pela da regulação negativa do receptor Fas, matando linfócitos pela ligação com FasL (RAJASHEKHAR et al., 2003). A interação Fas-FasL contribui para que a placenta seja uma região imunologicamente privilegiada (LEVY; NELSON, 2000).

A apoptose em células trofoblásticas pode ser iniciada pela ligação da citocina TNF- α aos seus receptores (TNF-R1 e TNF-R2), presentes nas células trofoblásticas (LEVY; NELSON, 2000). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos ativados por IFN- γ , induzem apoptose em células trofoblásticas. Essa indução está associada à secreção de TNF- α e de Indoleamina 2,3 – dioxigenase (IDO), que cataliza a degradação de triptofano das células trofoblásticas, reação indutora de apoptose (HUPPERTZ et al., 2006). Estudos demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , aumentam a expressão de Fas/FasL nas células trofoblásticas, enquanto, citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-6) diminuem a expressão de Fas/FasL e ativam proteínas que inibem a apoptose (ASCHKENAZI et al., 2002). As células trofoblásticas também apresentam inibidores de apoptose, como proteínas da família Bcl-2 e proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (HUPPERTZ et al., 2006).

O controle dos processos apoptóticos nas células trofoblásticas é extremamente importante e garante o sucesso da gestação. Além disso, o controle da apoptose durante o desenvolvimento embrionário normal é importante como forma de deleção de diversas proteínas associadas à letalidade e mal desenvolvimento fetal (HAEZELL; CROCKER, 2008). Estudos demonstraram que tanto o excesso quanto a deficiência da apoptose na placenta, estão associados aos abortos e as complicações durante a gestação (CROCKER et al., 2003; HUPPERTZ et al., 2006).

1.8.2 Apoptose e infecção por *T. gondii*

Toxoplasma gondii altera o programa apoptótico da célula hospedeira, promovendo ou inibindo a apoptose. Essa dupla atividade do parasito está associada com a interação do mesmo aos sinais pró e anti-apoptóticos da célula hospedeira (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). O parasito promove apoptose de algumas células para modular a resposta imune do hospedeiro. Com o aumento na expressão de Fas/FasL, linfócitos T e outros leucócitos são induzidos a entrar em apoptose. A apoptose exagerada dos leucócitos resulta em inabilidade do sistema imune do hospedeiro em controlar a infecção, causando intenso processo inflamatório que pode levar a um quadro fatal de toxoplasmose (LANG et al., 2007; LÜDER; GROSS, 2005).

Além da capacidade de *T. gondii* em aumentar a apoptose de algumas populações celulares após a infecção, o parasito também possui a capacidade de diminuir a morte celular do hospedeiro (LÜDER et al., 2009). A resistência à apoptose, mediada pelo parasito, já foi observada tanto em linhagens celulares humanas quanto murinas. Após o tratamento com diversos indutores de apoptose, incluindo citotoxicidade mediada por linfócitos, radiação, adição de fatores de crescimento, tratamento com TNF- α e outros agentes tóxicos (SINAI et al., 2004; LÜDER; GROSS, 2005). Além disso, *T. gondii* é capaz de diminuir a apoptose em cultura de células primárias após a adição de fatores de crescimento (LÜDER; GROSS, 2005). A inibição da apoptose, já foi demonstrada em experimentos *in vivo* após a infecção intraperitoneal de camundongos com *T. gondii*, isso sugere que a interferência do parasito com o programa apoptótico da célula hospedeira pode modificar o curso da toxoplasmose (JAMES; GREEN, 2004).

Evidências experimentais sugerem que o parasito inibe a apoptose das células hospedeiras por diferentes mecanismos. Enquanto a inibição direta da apoptose das células hospedeiras é restrita às que contém parasitos intracelulares, mecanismos indiretos protegem tanto as células infectadas quanto não infectadas da apoptose, através de produtos secretados por *T. gondii* (LÜDER; GROSS, 2005; LABBÉ; SALEH, 2008).

A inibição das vias intrínseca e extrínseca da apoptose por *T. gondii* parece ser dependente da ativação de NF- κ B (**Figura 3**). Essa ativação resulta em uma super-regulação da transcrição de genes anti-apoptóticos, e depende tanto da enzima I kappa Kinase (I κ K) do hospedeiro quanto da atividade da enzima do parasito (TgI κ K). Essas enzimas atuam fosforilando o inibidor de NF- κ B (I κ B α), após esse processo há translocação do NF- κ B, que situa-se no citoplasma quando inativo, para o núcleo da célula

(KIM et al., 2006). Entretanto, nos estágios iniciais da infecção não se observa ativação de NF- κ B (CARMEN; SINAI, 2007).

A ativação da via de sinalização fosfoinositol 3-kinase (PI3K) também inibe a apoptose (**Figura 3**). Essa inibição ocorre pela ligação de fatores de crescimento ao receptor PI3K, ativando-o. Há então a fosforilação de fosfatidil-inositol bifosfatado (PIP2), formando PIP3, que recruta a proteína kinase B PKB/AKT e kinase 1 dependente de fosfoinositol (PDK1) para a membrana celular. PDK1 ativa PKB/AKT que, por sua vez, degrada proteínas pró-apoptóticas da célula (CARMEN; SINAI, 2007). Estudos recentes demonstraram que nos estágios iniciais da infecção por *T. gondii*, as células infectadas apresentam altos níveis de AKT/PKB, sugerindo que, no início da infecção, a ativação de PI3K é responsável pela prevenção da apoptose (KIM; DENKERS, 2006).

O parasito também inibe apoptose da célula hospedeira interferindo na liberação do citocromo c, alterando o balanço de proteínas pró e anti-apoptóticas (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Estudos demonstraram que o parasito é capaz de induzir aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas e diminuir os níveis de proteínas pró-apoptóticas (**Figura 3**) (LÜDER et al., 2009).

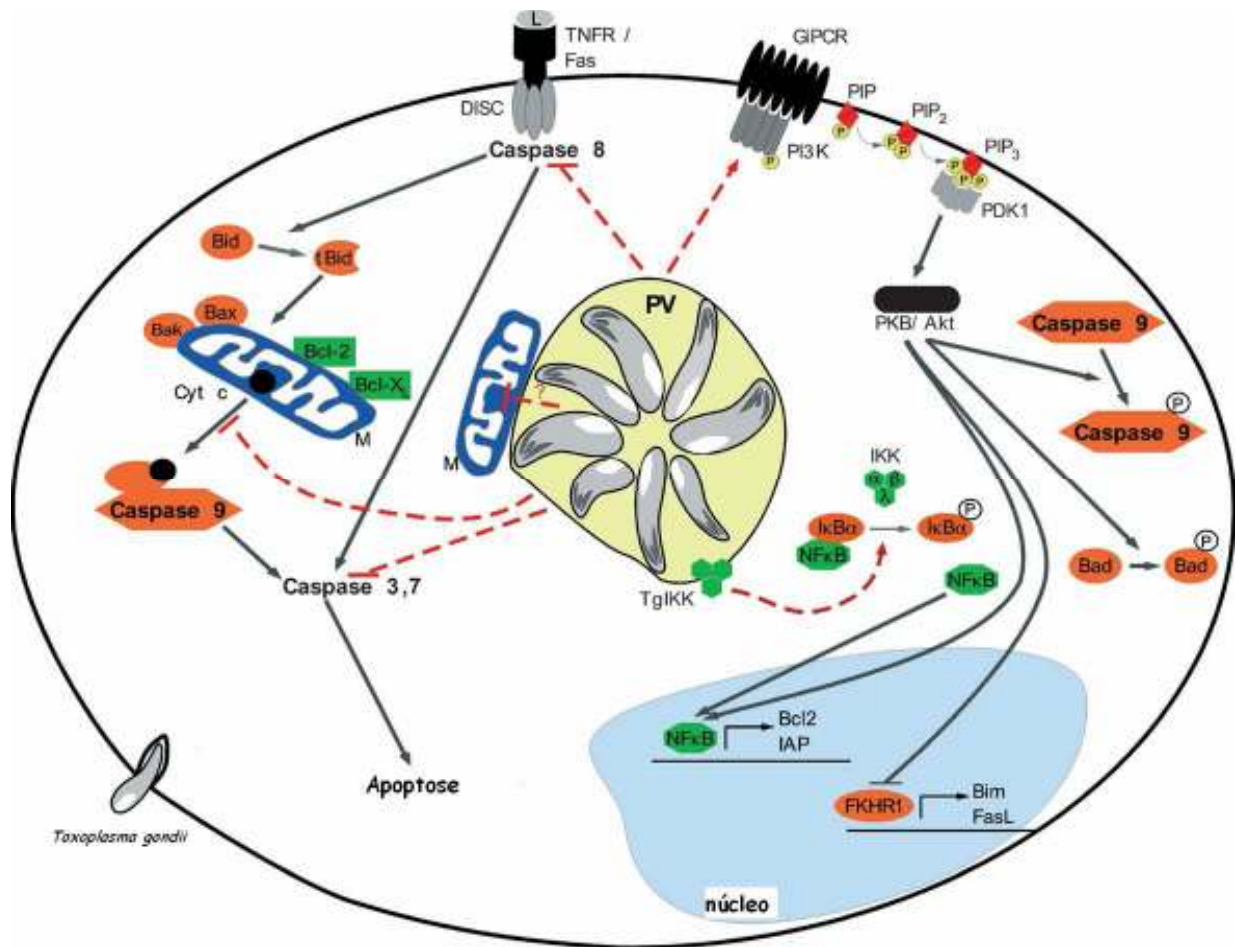


Figura 3: Influência de *T. gondii* nas vias apoptóticas da célula hospedeira. O parasito pode inibir a apoptose interferindo nas vias de NF-κB e PI3k, levando ao aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas. Além disso, *T. gondii* pode atuar degradando proteínas pró-apoptóticas, como Bid e Bad, e caspases efetoras. A associação do vacúolo parasitóforo (PV) às mitocôndrias da célula hospedeira pode estar associada à inibição da liberação do citocromo c pela organela (retirado e adaptado de LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

Dessa forma, o bloqueio da apoptose garante ao parasito a obtenção dos metabólitos e a sobrevivência no interior da célula hospedeira (DENKERS, 2003). A inibição da apoptose também é de fundamental importância para a fase crônica da infecção. Como os bradizoítas apresentam replicação mais lenta do que a de taquizoítas, eles necessitam de um tempo maior para sua sobrevivência (HEUSSLER et al., 2001). Além disso, a desregulação do processo apoptótico de algumas populações celulares, durante a infecção por *T. gondii*, pode resultar em uma patologia acentuada e até na morte

do hospedeiro (LANG et al., 2007), uma vez que o grau de patogenicidade da toxoplasmose pode estar associado a um processo de apoptose incontrolável (GAVRILESCU; DENKERS, 2003).

2. Justificativa

Considerando que o grau de patogenicidade da toxoplasmose pode estar associada ao controle da apoptose da célula hospedeira mediado por *T. gondii* e que o processo de apoptose em células trofoblásticas é de fundamental importância para o sucesso gestacional, este trabalho se justifica pela necessidade de melhor entendimento dos mecanismos de inter-relação biológica entre *T. gondii* e as células trofoblásticas que estão envolvidos em uma importante situação clínica: a toxoplasmose congênita.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Objetivou-se analisar a influência de cepas de alta virulência (RH) e baixa virulência (ME49) de *Toxoplasma gondii*, na incidência de apoptose e proliferação celular em células trofoblásticas da linhagem BeWo. Comparativamente, foram utilizadas células epiteliais de cérvix uterino (linhagem HeLa).

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a incidência de apoptose em células BeWo ou HeLa infectadas com a cepa RH ou ME49 de *T. gondii*
- Analisar o índice de células apoptóticas com parasitos intracelulares, infectadas com a cepa RH ou ME49 de *T. gondii*
- Verificar a presença de caspase 3 ativa em células não infectadas e após a infecção com a cepa RH ou ME49 de *T. gondii*
- Analisar a proliferação celular após a infecção pela cepa RH ou ME49 de *T. gondii*

4. Materiais e métodos

4.1 Cultura de células BeWo e HeLa

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

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm² (Ciencor Scientific, Brasil) contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Chemical CO., Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultlab, Brasil) e 1% de antibióticos (10.000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Cultlab, Brasil), L-glutamina, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e 2β-mercaptoetanol (Sigma Chemical CO., Brasil) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

O repique das células foi realizado a cada três dias pela adição de novo meio de cultura aos frascos e, com auxílio de “cells scrapers” (Ciencor Scientific, Brasil), as células foram retiradas, transferidas para tubos de 15ml e centrifugadas a 1500rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o “pellet” foi ressuspenso em 1 ml de meio com soro e distribuído em dois novos frascos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento (90% de SFB e 10% de DMSO em meio de cultura RPMI-1640 10%).

4.2 Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii*

4.2.1 Manutenção *in vivo*

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

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, por meio de passagens seriadas com intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 10⁶ taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO et al., 1980).

4.2.2 Manutenção *in vitro*

Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfatos a 0,01 M (PBS, pH 7,2) estéril e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação (1500rpm, 5 minutos). Em seguida, o “pellet” foi ressuspensão em 0,5ml de meio RPMI-1640 e inoculado em monocamadas celulares de BeWo ou HeLa, com a finalidade de manter *in vitro* *T. gondii*, nas respectivas linhagens celulares.

Quando a maioria das células infectadas em cultura foi lisada pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15ml, centrifugado a 1500rpm por cinco minutos em temperatura ambiente e o “pellet” foi ressuspensão em 1ml de meio RPMI e inoculado em dois frascos contendo células não infectadas.

4.3 Manutenção da cepa ME49 de *T. gondii*

Taquizoítas de *T. gondii* da cepa ME49, obtidos de cérebros de camundongos infectados cronicamente, foram mantidos em cultura de fibroblasto humano – HFF (cedidos pelo Laboratório de Medicina Tropical e Infectologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba/MG).

Quando as células encontravam-se lisadas pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15ml, centrifugado a 500rpm, por um minuto em temperatura ambiente para remoção de debris celulares. O sobrenadante contendo taquizoítas foi ressuspensão em 0,5ml e inoculados em monocamadas celulares da linhagem BeWo ou HeLa com a finalidade de manter a cepa nestas linhagens celulares.

Quando a maioria das células infectadas em cultura foi lisada pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15ml, centrifugado a 1500rpm por cinco minutos em temperatura ambiente e o “pellet” foi ressuspensão em 1ml de meio RPMI e inoculado em dois frascos contendo células não-infectadas.

4.4 Análise de apoptose e proliferação celular em células BeWo e HeLa infectadas ou não por *T. gondii*

Células BeWo e HeLa foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com 10% de SFB e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan (Sigma Chemical CO., Brasil). Após o ajuste para uma concentração de 5×10^4 células (200 μ l/poço), as mesmas foram transferidas para uma placa de cultura de 24 poços (Ciencor Scientific, Brasil) e cultivadas sobre lamínulas de 13mm de diâmetro, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e parasitos da cepa RH ou ME49 de *T. gondii* foram adicionadas aos poços, separadamente, nas proporções de 2 e 5 parasitos por célula (2:1 e 5:1). Após 2, 6 e 12 horas de interação, as células foram fixadas em formalina tamponada 10%, por 24 horas, para posteriores análises morfológica e imuno-histoquímica. O mesmo procedimento foi realizado na ausência de taquizoítas de *T. gondii* (controle). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.4.1 Imuno-histoquímica para detecção de apoptose utilizando anticorpo monoclonal M30

Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com TBS e incubadas por oito minutos em solução de ácido acético a 5% para bloqueio da fosfatase endógena. Em seguida foram lavadas três vezes, em solução salina tamponada com TRIS 0,05 M, pH 7,4, acrescida de 2,5 % de cloreto de Sódio (TBS) por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lamínulas foram incubadas com soro normal de cabra a 2,5% em TBS por 45 minutos a 37°C; após este bloqueio, foi feita a incubação das células com anticorpo monoclonal de camundongo anti-citoqueratina 18 (clone M30, CytoDEATH, Roche Applied Science, USA), na diluição de 1:250 em TBS por 12 horas a 4°C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lamínulas foram incubadas com IgG de cabra anti - IgG de camundongo biotinizada (Sigma) na diluição de 1:600 em TBS por uma hora a 37° C. Após sucessivas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC) - fosfatase (Biomeda, Foster city, USA) na proporção de 16:1000 em TBS a 37° C por 30 minutos. Após novas lavagens em TBS, a revelação da enzima fosfatase alcalina foi realizada com fast red – naftol (Sigma, St Louis, USA), em tampão TBS, lavagens em TBS e água corrente e contra - coloração com hematoxilina de Meyer, por 8 minutos à

temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lamínulas foram montadas em lâminas em glicerina.

4.4.2 Análise de incidência de apoptose

As células foram quantificadas quanto à porcentagem de células apoptóticas a cada 100 células examinadas, infectadas ou não (índice de apoptose). Analisou-se também a porcentagem (índice) de células apoptóticas com parasitos intracelulares 100 células infectadas examinadas.

4.4.3 Imunohistoquímica para detecção de proliferação celular utilizando anticorpo NCL-PCNA

Após a fixação, as células foram incubadas por oito minutos em solução de ácido acético a 5% para bloqueio da fosfatase endógena, em seguida foram lavadas três vezes, em solução salina tamponada com TRIS 0,05 M, pH 7,4, acrescida de 2,5 % de cloreto de Sódio (TBS) por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lamínulas foram incubadas com soro normal de cabra a 2,5% em TBS por 45 minutos a 37°C; após este bloqueio, foi feita a incubação das células com anticorpo monoclonal de camundongo anti antígeno nuclear de proliferação celular (NCL-PCNA, Novocastra Laboratories, Newcastle, United Kingdom), na diluição de 1:100, em TBS por 60 minutos a 25° C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lamínulas foram incubadas com IgG de cabra anti - IgG de camundongo biotinizada (Sigma, St Louis, USA) na diluição de 1:600 em TBS por uma hora a 37° C. Após sucessivas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC) - fosfatase (Biomed, Foster city, USA) na diluição de 16:1000 em TBS, a 37° C por 30 minutos. Após novas lavagens em TBS, houve a revelação da enzima fosfatase alcalina com fast red – naftol (Sigma, St Louis, USA), em tampão TRIS, lavagens em TBS e água corrente e contra - coloração com hematoxilina de Meyer, por 8 minutos à temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lamínulas foram montadas em lâminas em glicerina.

4.4.4 Análise de incidência de proliferação celular

As células foram quantificadas quanto à porcentagem de células em proliferação a cada 100 células examinadas, infectadas ou não (índice de proliferação celular).

4.5 Detecção de caspase 3 ativa por microscópio confocal

Células BeWo e HeLa foram cultivadas em lamínulas de 13mm, em placas de 24 poços (5×10^4 células/poço) por 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii*, cepas RH e ME49, nas proporções de 2:1 e 5:1 (parasitos/células). Como controle, células foram apenas com meio de cultura. Após 12 horas as células vivas foram incubadas com NucView 488 – solução com substrato de caspase 3 – 0,2M (Biotium, Inc., Hayward, CA), por 4 horas em temperatura ambiente. Como controle da reação, células foram incubadas com inibidor de caspase 3. Em seguida, as células foram fixadas em formol 3,75%, por 20 minutos. Os núcleos das células foram contra-corados com DAPI $10\mu\text{M}$ (Sigma Chemical CO.) por 10 minutos. As lâminas foram montadas utilizando-se uma solução de montagem para fluorescência (1ml de tampão carboneto: 9ml de glicerol) e, posteriormente, analisadas em microscópio confocal (Carl Zeiss LSM 510 Meta, Jena, Germany).

4.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados como média e desvio padrão e as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste ANOVA, pós teste de Bonferroni (Graph Pad Software, v. 5.0, San Diego, USA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Cepas RH e ME49 de *T. gondii* apresentaram efeitos opostos na modulação da apoptose em células BeWo e HeLa

Para verificar o índice de apoptose realizou-se imuno-histoquímica utilizando o anticorpo M30. Observou-se o processo de apoptose tanto nas células não-infectadas quanto nas infectadas com as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (Figura 1).

Células BeWo, infectadas com a cepa RH de *T. gondii*, foram menos susceptíveis ao processo de morte celular por apoptose do que as células não-infectadas (Figura 2A). Assim, nos três tempos de infecção analisados (2, 6 e 12 horas) as células BeWo infectadas com a cepa RH apresentaram menores índices de apoptose em relação aos respectivos controles (Figura 2A). Com 12 horas de infecção, células BeWo com maior taxa de infecção (5 parasitos por célula) foram menos susceptíveis à apoptose do que as células com menor taxa de infecção (2 parasitos por célula) ($p < 0,001$) (Figura 2A). Resultados opostos foram observados com a cepa ME49. Células infectadas demonstraram índices de apoptose maiores do que as células não infectadas ($p < 0,001$), nos três tempos de infecção analisados (Figura 2A). Quando comparou-se o índice de apoptose entre as diferentes taxas de infecção, observou-se que nos três tempos analisados, as células infectadas com maior taxa de infecção (5 parasitos por célula) apresentaram índices significativamente maiores ($p < 0,01$) do que células infectadas com 2 parasitos por célula. Além disso, os resultados demonstraram que com 12 horas de infecção e maior taxa de parasitismo (5 parasitos por célula), o índice de apoptose foi maior do que o observado após 2 e 6 horas de infecção ($p < 0,001$). Já com a menor taxa de infecção (2 parasitos por célula) houve diferença significativa apenas entre os tempos de infecção de 2 e 12 horas ($p < 0,001$; Figura 2A).

As células infectadas com a cepa ME49 apresentaram diferentes índices de apoptose em relação às infectadas com a cepa RH de *T. gondii*. A comparação realizada entre as cepas demonstrou que em ambas as taxas de infecção (2:1 e 5:1 parasitos/célula) e nos três tempos de infecção analisados (2, 6 e 12 horas), os índices de apoptose das células infectadas com a cepa RH foram significativamente menores ($p < 0,0001$) do que os observados em células infectadas com a cepa ME49 (Figura 2A).

Resultados semelhantes foram observados em células HeLa. Quando infectadas com a cepa RH de *T. gondii* os índices de apoptose observados foram significativamente

menores ($p < 0,0001$) do que os observados nos controles, nos três tempos de infecção analisados (Figura 2B). Células infectadas por 12 horas apresentaram índices de apoptose significativamente menores ($p < 0,01$) do que os observados após 2 horas de infecção. Além disso, com maior taxa de parasitismo (5 parasitos por célula) os índices de apoptose foram menores do que os observados com a taxa de parasitismo de 2 parasitos por célula. Entretanto, só houve diferença significativa com 2 horas de infecção ($p < 0,001$; Figura 2B).

Células HeLa infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* apresentaram índices de apoptose semelhantes aos observados em células BeWo. Nos três tempos de infecção analisados os índices de apoptose do controle foram significativamente menores ($p < 0,001$) do que os observados em células infectadas (Figura 3B). Além disso, verificou-se que na medida em que aumentou-se o tempo de infecção os índices de apoptose também aumentaram, já que com 12 horas de infecção os índices foram significativamente maiores ($p < 0,01$) do que os observados com 2 horas de infecção (Figura 2B).

A comparação realizada entre as cepas demonstrou que em ambas as taxas de infecção e nos três tempos analisados, os índices de apoptose de células HeLa infectadas com a cepa ME49 foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) do que os observados em células infectadas com a cepa RH (Figura 2B).

5.2 Células BeWo e HeLa com parasitos intracelulares apresentaram menores índices de apoptose do que células não parasitadas.

Células BeWo infectadas com a cepa RH apresentaram índices de células apoptóticas com parasitos intracelulares significativamente menores ($p < 0,0001$) do que os índices de células infectadas com a cepa ME49, nos três tempos de infecção analisados: 2, 6 e 12 horas (Figura 3A). Em relação às duas proporções de parasitos/célula analisadas, não foram observadas diferenças entre as células infectadas com a cepa RH, com menor taxa de parasitismo (2 parasitos por célula) e as infectadas com maior taxa de parasitismo (5 parasitos por célula). Já as células infectadas com a cepa ME49, na proporção de 5 parasitos por célula, apresentaram índices de células apoptóticas com parasitos intracelulares significativamente maiores ($p < 0,01$) do que as células infectadas com 2 parasitos por célula, nos tempos de infecção de 6 e 12 horas (Figura 3A).

Células HeLa infectadas com 2 parasitos por célula, cepa RH, apresentaram índices de células apoptóticas com parasitos intracelulares significativamente menores do que as células infectadas com a cepa ME49, após 6 e 12 horas de infecção ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Além disso, células infectadas com a cepa ME49 por 12 horas, apresentaram índices maiores do que os observados em células com 6 horas de infecção (Figura 3B). Células infectadas com a cepa ME49, nos três tempos de infecção analisados, apresentaram índices de células apoptóticas com parasitos intracelulares significativamente maiores do que os índices de células infectadas com a cepa RH. Observou-se também que as células infectadas com a cepa ME49, por 12 horas, apresentaram índices de células apoptóticas com parasitos intracelulares significativamente maiores ($p < 0,001$) do que os índices de células com 2 horas de infecção (Figura 3B).

5.3 Células infectadas por *T. gondii* e não-infectadas apresentaram caspase 3 ativa

Nas populações de células BeWo e HeLa foi possível observar caspase 3 ativa tanto nas células não-infectadas quanto naquelas infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*, independentemente dos períodos de tempo analisados ou taxas de infecção (dados não quantificados) (Figura 4).

5.4 Células BeWo e HeLa infectadas com *T. gondii* proliferam mais do que células não-infectadas.

Utilizando o antígeno de proliferação celular (PCNA), foi possível observar imunomarcações nucleares tanto em células BeWo e HeLa não-infectadas, quanto em células infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* (Figura 5).

Células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii* apresentaram maiores índices de proliferação celular do que o controle, em ambas as proporções de parasitos/célula (2:1 e 5:1) e nos três tempos de infecção analisados (2, 6 e 12 horas). O índice de proliferação foi significativamente maior ($p < 0,001$) com 12 horas de infecção do que o observado com 2 horas (Figura 6A). Células infectadas com 5 parasitos/células apresentaram índices de proliferação celular maiores do que aquelas infectadas com a proporção de 2:1, embora com diferenças significativas somente com 2 horas de infecção ($p < 0,01$).

Células BeWo infectadas com a cepa ME49 apresentaram índices de proliferação celular significativamente maiores ($p < 0,0001$) do que os observados nos respectivos controles, nos três tempos de infecção analisados e em ambas as taxas de infecção. Observou-se também que células com 12 horas de infecção apresentaram índices significativamente maiores do que os índices observados com 2 e 6 horas de infecção ($p < 0,001$). Além disso, os índices de proliferação celular de células infectadas com a proporção de 5:1, foram maiores do que os observados com 2 parasitos/célula, nos três tempos de infecção analisados (Figura 6A).

Células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii* apresentaram menores índices de proliferação celular do que os observados em células infectadas com a cepa ME49, em ambas as proporções de parasitos/célula e nos três tempos de infecção analisado (Figura 6A).

Resultados semelhantes foram observados com células HeLa (Figura 6B). Os índices de proliferação celular das células infectadas com a cepa RH foram significativamente maiores do que os observados nos controles, nas duas proporções de parasitos/célula e nos três tempos de infecção analisados. Assim como observado com a linhagem BeWo, células HeLa infectadas com a proporção 5:1 da cepa RH apresentaram maiores índices de proliferação celular do que as infectadas com 2 parasitos/célula, nos três tempos de infecção analisados (Figura 6B).

De maneira semelhante ao observado em células HeLa infectadas com a cepa RH, células infectadas com a cepa ME49 apresentaram índices de proliferação celular maiores do que os observados nos respectivos controles, nos três tempos de infecção analisados ($p < 0,0001$). Esse aumento no índice foi proporcional ao tempo, já que, células infectadas por 12 horas apresentaram índices significativamente maiores do que as células com 2 horas de infecção ($p < 0,001$). Além disso, células infectadas com a proporção de 2:1 apresentaram índices de proliferação celular menores do que os observados com a taxa de infecção de 5 parasitos/célula, nos três tempos de infecção analisados (Figura 6B).

A comparação realizada entre as duas cepas de *T. gondii* revelou que células HeLa, infectadas com a cepa ME49, apresentaram maiores índices de proliferação celular quando comparadas com células infectadas com a cepa RH, nos três tempos de infecção e em ambas as proporções parasitos/célula (Figura 6B).

6. Discussão

A apoptose é um importante mecanismo biológico que promove a remoção de células danificadas e não desejadas durante o desenvolvimento, garante a homeostase tecidual e a seleção do repertório linfocitário. Além disso, a apoptose é um mecanismo de defesa contra microorganismos durante a imunidade inata e adaptativa (LÜDER; GROSS, 2001). Entretanto, vírus, bactérias e protozoários desenvolveram mecanismos para modular o processo de apoptose da célula hospedeira, garantindo a sobrevivência no interior das células. *T. gondii* é um dos protozoários que atua manipulando a apoptose da célula hospedeira, bem como outras vias celulares importantes, como regulação da glicólise, metabolismo de lipídeos e colesterol, organização do citoesqueleto e do ciclo celular (LANG et al., 2007; LÜDER et al., 2008).

Esse mecanismo de morte celular também é crucial durante a gestação. Como a placenta é fundamental nos processos de trocas gasosas e de nutrientes entre a mãe e o feto, a diminuição ou o aumento de apoptose nas células trofoblásticas pode acarretar em complicações durante a gestação, causando inclusive abortos (LEE et al., 2005). Desta forma, alterações na incidência de apoptose durante os períodos iniciais de gestação podem causar alterações na morfologia e nos aspectos fisiológicos da placenta, causando problemas no desenvolvimento fetal (KAPONIS et al., 2008; HEAZELL; CROCKER, 2008).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que nos estágios iniciais da infecção, tanto as células trofoblásticas BeWo quanto as células HeLa, infectadas com a cepa RH de *T. gondii*, apresentaram menores índices de apoptose do que as células não-infectadas. Além disso, os índices de apoptose foram menores em células infectadas com a maior taxa de infecção (5 parasitos por célula). Esses resultados demonstram possível interferência de *T. gondii* no programa apoptótico da célula hospedeira, e estão de acordo com dados da literatura que demonstraram que células infectadas pelo parasito são resistentes a diversos estímulos indutores de apoptose, como radiação UV e citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos (BANNAI et al., 2008).

Células BeWo e HeLa infectadas com a cepa de baixa virulência ME49 apresentaram resultados opostos aos observados na infecção com cepa RH. Células infectadas apresentaram índices de apoptose maiores do que as células não-infectadas, nos três tempos de infecção analisados e em ambas as taxas de infecção, demonstrando que a cepa ME49 apresenta um comportamento inverso ao da cepa RH promovendo aumento da

apoptose das células hospedeiras, nos estágios iniciais da infecção. Hippe e colaboradores (2008) realizaram estudos que mostraram que após 24 e 36 horas de infecção parasitos da cepa ME49 atuam bloqueando a apoptose da célula hospedeira através da interferência da liberação do citocromo c pela mitocôndria. Além disso, estudos demonstraram uma estreita ligação entre a indução de apoptose por patógenos e os efeitos de morte celular na resistência à infecção, indicando que muitas vezes a indução da apoptose pelo parasito tem um efeito protetor para o hospedeiro. Essa situação foi observada em estudos realizados com a bactéria *Helicobacter pylori* e demonstraram que camundongos infectados pela bactéria e deficientes em receptor de morte Fas, apresentavam aumento na gravidade de doenças gástricas (LABBÉ; SALEH, 2008).

Dessa forma, os resultados apresentados nesse trabalho podem indicar um mecanismo protetor que a cepa ME49, de baixa virulência, apresenta. Pois o aumento nos índices de apoptose pode significar diminuição da parasitemia e, conseqüentemente, dos níveis de citocinas pró-inflamatórias liberadas.

Essa diferença entre cepas de *T. gondii* foi melhor determinada quando realizou-se a análise do índice de células apoptóticas com parasitos intracelulares, através da qual foi possível verificar que células BeWo e HeLa infectadas com a cepa RH apresentaram menores índices de células apoptóticas com parasitos intracelulares do que aquelas que foram infectadas com a cepa ME49. Isto sugere que a incidência de apoptose pode estar relacionada à virulência da cepa do parasito.

Diversos estudos realizados mostraram a associação entre a incidência de apoptose e a virulência das cepas de *T. gondii*. Em camundongos infectados com cepas de alta virulência do parasito, observou-se diminuição da apoptose (DEBIERRE-GROCKIEGO, 2007). De maneira inversa, estudos realizados com camundongos demonstraram que eventos tardios da infecção por cepa de alta virulência estão associados ao aumento na produção de IFN- γ e altos níveis de apoptose (MORDUE et al., 2001). Gavrilescu e Denkers (2003) demonstraram que os altos níveis de apoptose observados após a infecção com cepa RH não estão associados com o parasito propriamente dito, mas sim com os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias liberadas após a infecção por cepas de alta virulência de *T. gondii*. Além disso, estudos *in vivo* mostraram que tanto a cepa RH quanto a ME49 possuem capacidade de induzir apoptose. No entanto, o processo apoptótico ocorre com maior frequência em órgãos infectados pela cepa RH (GAVRILESCU; DENKERS, 2001).

Os resultados deste trabalho demonstraram que as diferenças entre células apoptóticas com parasitos intracelulares após a infecção com as cepas RH e ME49 de *T. gondii*, são mais marcantes nas células trofoblásticas BeWo do que nas células HeLa. Senegas e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento de apoptose em células trofoblásticas infectadas com a cepa ME49 está relacionado com a liberação de IFN- γ , uma vez que camundongos deficientes para o receptor dessa citocina não apresentaram aumento da apoptose. Além disso, esses autores confirmaram que a IDO, presente na interface materno-fetal apresenta efeito pró-apoptótico. Apesar de células BeWo não apresentarem IFN- γ e IDO constitutivamente, durante a gestação a presença dessa citocinas em níveis moderados e o aumento na apoptose induzida por esses componentes pode conferir certa proteção ao hospedeiro.

Possivelmente, a cepa ME49 induza o aumento de apoptose como mecanismo atenuador da infecção. Além disso, em condições naturais de gestação a infecção por essa cepa pode representar menor ameaça do que a cepa RH, que inibe a apoptose para garantir sua sobrevivência, mas por outro lado, a redução da morte celular pode também contribuir para o aumento da resposta inflamatória, observada em infecções com cepas de alta virulência, levando ao aumento da imunopatologia e complicações durante a gestação. Além disso, estudos demonstraram que o aumento de citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de Fas e FasL em células trofoblásticas, aumentando a apoptose dessas células (ASCHKENAZI et al., 2002). Esse possível efeito protetor da ME49 pode estar associado ao fato dessa cepa predominar em casos de toxoplasmose congênita benigna ou assintomática (AJZENBERG et al., 2002; SAEIJ et al., 2005).

As análises para detecção de caspase 3 ativa revelaram que tanto as células infectadas, por *T. gondii*, quanto as não infectadas apresentaram caspase 3 ativa. Inclusive as células infectadas pela cepa RH que apresentaram baixos índices de apoptose.

Esses resultados podem ser explicados pela capacidade do parasito de inibir a caspase 3 mesmo após a ativação da mesma (SINAI et al., 2004; GUILHERMO et al., 2008). Além disso, não quantificou-se caspase 3 ativa e pode ser que em células infectadas pela cepa RH haja menos caspase ativa do que nas células infectadas pela cepa ME49 e células não-infectadas. Já está descrito na literatura que o parasito tem a capacidade de diminuir a ativação das caspases efetoras através da interferência em várias cascatas de ativação de caspase da célula hospedeira. Uma delas está relacionada à inibição da via extrínseca da apoptose, já que o parasito atua clivando ou degradando a caspase 8 que é

iniciadora desta via (VUTOVA et al., 2007; LÜDER et al., 2008). No entanto, a principal interferência de *T. gondii* é na via intrínseca da apoptose. A modulação desta via pode ser a nível transcricional, através da ativação de NF- κ B ou pós-transcricional, pela degradação de diversas proteínas pró-apoptóticas (Nelson et al., 2008). Nesse último caso, o parasito atua degradando as proteínas pró-apoptóticas (como Bax, Bad, Bid) e aumentando a expressão das proteínas anti-apoptóticas (como Bcl-2 e Mcl-1) (CARMEN; SINAI, 2007). O parasito também estimula a expressão das proteínas inibidoras de apoptose (IAP) que atuam diretamente na caspase 3 ativa degradando-a (MOLESTINA et al., 2003).

Além disso, a inibição da apoptose pode-se dar pela interferência na liberação do citocromo c, já que após a infecção e a formação do vacúolo parasitóforo, *T. gondii* recruta mitocôndrias, que se associam a membrana do vacúolo. Acredita-se que essa íntima associação esteja relacionada com a interferência direta do parasito nas funções da mitocôndria, dentre elas a apoptose (CARMEN et al., 2006; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Entretanto, Carmen e colaboradores (2006) demonstraram que o bloqueio da liberação do citocromo c ocorre em todas as mitocôndrias da célula hospedeira, e não apenas que ficam associadas ao vacúolo parasitóforo. Isto sugere que o parasito secreta moléculas que promovam alterações na liberação do citocromo c. Outros eventos também estão associados ao bloqueio da apoptose, como a diminuição da ativação da proteína JNK que ativa a proteína quinase ativada por mitose (MAPK) responsável pela transmissão de estímulos apoptogênicos até a mitocôndria, levando a liberação do citocromo c (CARMEN et al., 2008).

Dessa forma, nos estágios iniciais da infecção os parasitos da cepa RH podem atuar, por meio dessas vias, manipulando a célula hospedeira e induzindo diminuição dos índices de apoptose por nós observada. Enquanto que, parasitos da cepa ME49 não interferem nessas vias no início da infecção, sendo talvez necessário um período de infecção maior para que essa cepa bloqueie a apoptose, como demonstrado em trabalhos que verificaram que nos estágios tardios da infecção há inibição da apoptose pela cepa ME49 (HIPPE et al., 2008). Assim, a parasitemia no início da infecção pela cepa ME49 de *T. gondii* pode ser menor e melhor controlada pelo sistema imune. Entretanto, estudos *in vivo* são necessários para confirmar essa hipótese.

Os resultados de proliferação celular demonstraram que células infectadas com ambas as cepas de *T. gondii* proliferam mais do que as células não infectadas, nos estágios iniciais da infecção pelo parasito. Esses resultados podem ser explicados pela interferência

no ciclo da célula hospedeira que o parasito apresenta. Estudos demonstraram que pelo menos dez proteínas importantes no processo de mitose e proliferação celular são aumentadas após a infecção por *T. gondii*. Além disso, o parasito recruta microtúbulos e centrômeros que ficam associados ao vacúolo parasitóforo e, assim, o protozoário interfere na iniciação e na progressão da mitose das células hospedeiras (NELSON et al., 2008).

Lavine e Arrizabalaga (2009) demonstraram que células parasitadas por *T. gondii* são capazes de liberar fatores que induzem células não infectadas a entrar mais precocemente na fase S (fase de síntese) do ciclo celular. Esses fatores liberados também podem induzir a própria célula parasitada a entrar em processo de proliferação celular. Entretanto, outros estudos demonstraram que a infecção *in vitro* de células humanas é capaz de inibir a taxa de proliferação celular, promovendo rápida entrada na fase G2 e longa permanência nesta fase, através da interferência em reguladores da divisão celular, como por exemplo a proteína UHRF1 (uma ubiquitina) (BRUNET et al., 2008).

O aumento da proliferação celular também pode estar associado com estratégias do parasito para modular as funções intracelulares e se manter na célula hospedeira. Estudos demonstraram que o auto-antígeno 1, um gene que regula negativamente o ciclo celular, diminui o crescimento celular do parasito e induz transição precoce para a forma bradizoíta de *T. gondii* (RADKE et al., 2006).

Molestina e colaboradores (2008) também demonstraram que *T. gondii* possui estratégias para induzir sinais de crescimento celular induzindo uma “resposta de proliferação”, simultaneamente a inibição da progressão do ciclo celular. Observou-se que através da manipulação da atividade de ciclinas o parasito induz a célula a entrar em fase S permanecendo nesta fase por mais tempo do que o observado em células não infectadas. Essa permanência da célula hospedeira na fase S é importante para o parasito, pois para se manter vivo ele necessita de nutrientes do hospedeiro, dentre eles arginina, triptofano, poliaminas, purinas, colesterol e ferro (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

Os resultados aqui apresentados também demonstraram que células infectadas pela cepa ME49 proliferam mais do que as infectadas com a cepa RH. Esses resultados mostram, novamente, comportamentos opostos das cepas de *T. gondii*. Provavelmente, a cepa de baixa virulência ME49 aumenta a proliferação de células hospedeiras como de forma a atenuar a infecção diminuindo os danos ao tecido hospedeiro que pode ser causado pelo aumento da apoptose. Além disso, esse mecanismo pode estar associado ao aumento

nos índices de apoptose da célula hospedeira observados após a infecção pela cepa ME49. Uma vez que, o aumento no processo de morte celular pode induzir aumento da divisão de células saudáveis, um processo chamado de proliferação compensatória induzida por apoptose. Segundo essa hipótese células que estão em processo de morte celular podem se comunicar com as células vizinhas saudáveis, induzindo a proliferação das mesmas para manutenção da homeostase tecidual (FAN; BERGMANN, 2008).

É evidente que essas interferências de *T. gondii* sobre o comportamento das células hospedeiras são importantes fatores patogênicos e podem ser críticos para o desenvolvimento do quadro clínico da toxoplasmose. Além disso, com os dados aqui mostrados, pode-se inferir que as alterações na apoptose e no ciclo celular estão relacionadas aos fatores de virulência das cepas de *T. gondii*. Assim, novos estudos são necessários para o entendimento dos mecanismos de interferência que diferentes cepas de *T. gondii* apresentam sobre a modulação de vias intracelulares de sinalização que levam a apoptose e também a proliferação celular.

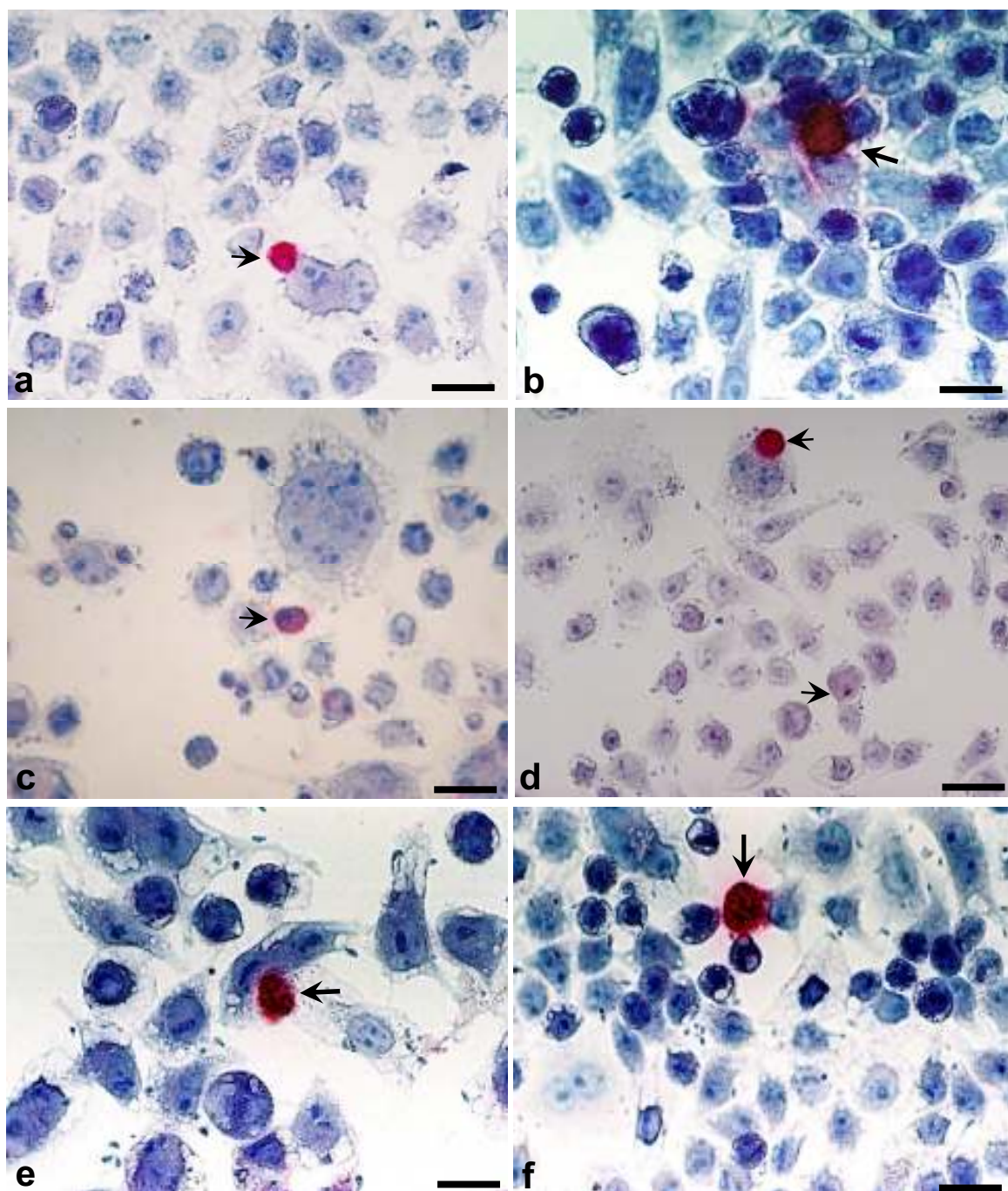
7. Conclusões

- A incidência de apoptose em células BeWo e HeLa infectadas com a cepa RH foi menor do que o observado em células infectadas com a cepa ME49 e em células não infectadas;
- Células infectadas com a cepa ME49 apresentaram maior incidência de células apoptóticas do que as células não infectadas;
- O índice de células apoptóticas com parasitos intracelulares foi menor em células infectadas com a cepa RH do que o observado com a cepa ME49;
- Detectou-se caspase 3 ativa tanto em células infectadas pelas cepas RH e ME49, quanto em células não infectadas;
- Células infectadas pelas cepas RH e ME49 apresentaram maiores índices de proliferação celular do que as não-infectadas. Além disso, células infectadas com a cepa ME49 proliferaram mais do que as infectadas com a cepa RH.

Dessa forma, todos os resultados demonstraram que a cepa de alta (RH) e baixa virulência (ME49) possuem mecanismos opostos de interferência nos mecanismos de apoptose e proliferação de células trofoblásticas BeWo. Essas diferenças podem estar associadas com estratégias de sobrevivência e permanência de *T. gondii* na célula hospedeira.

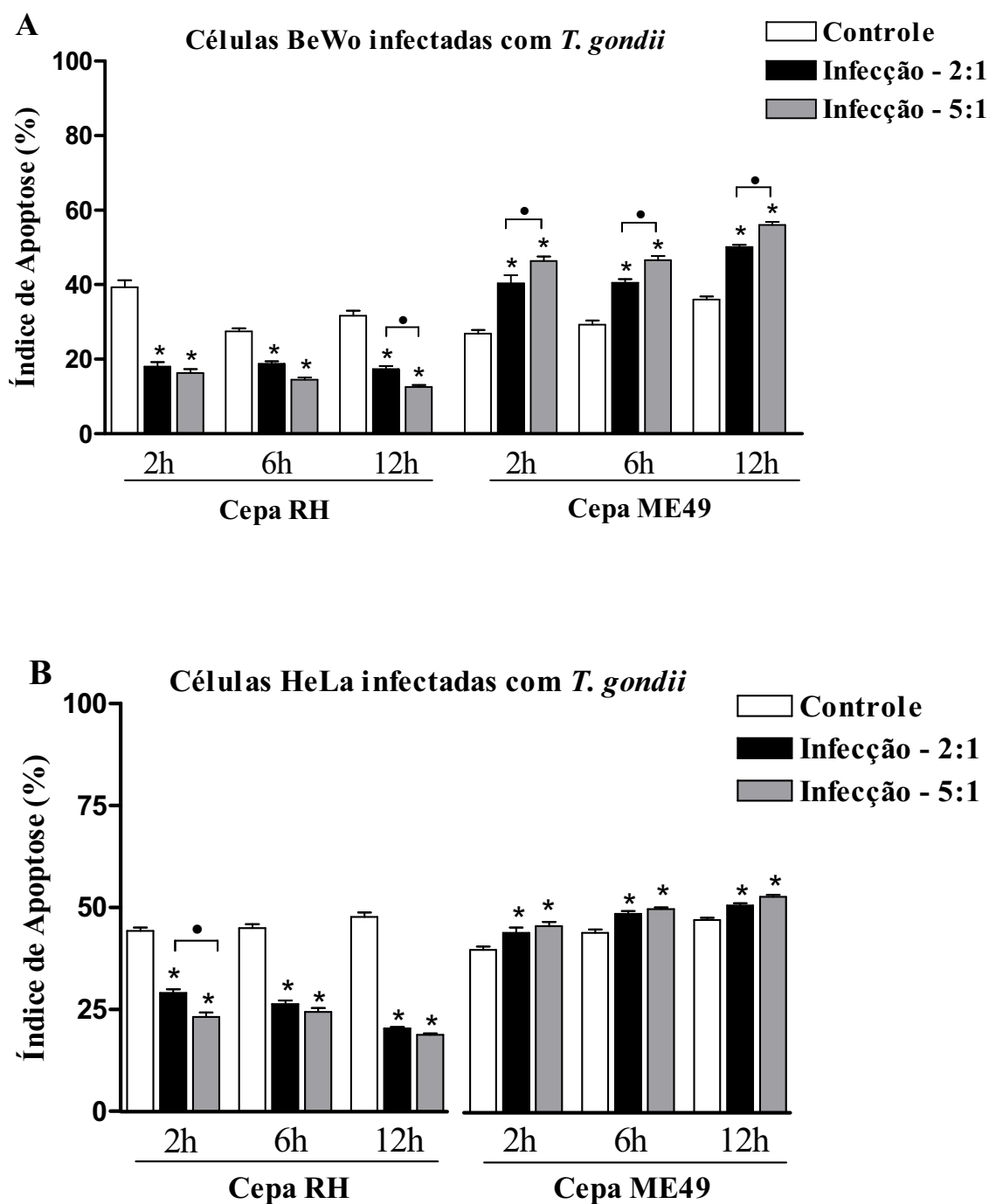
8. Figuras

Figura 1



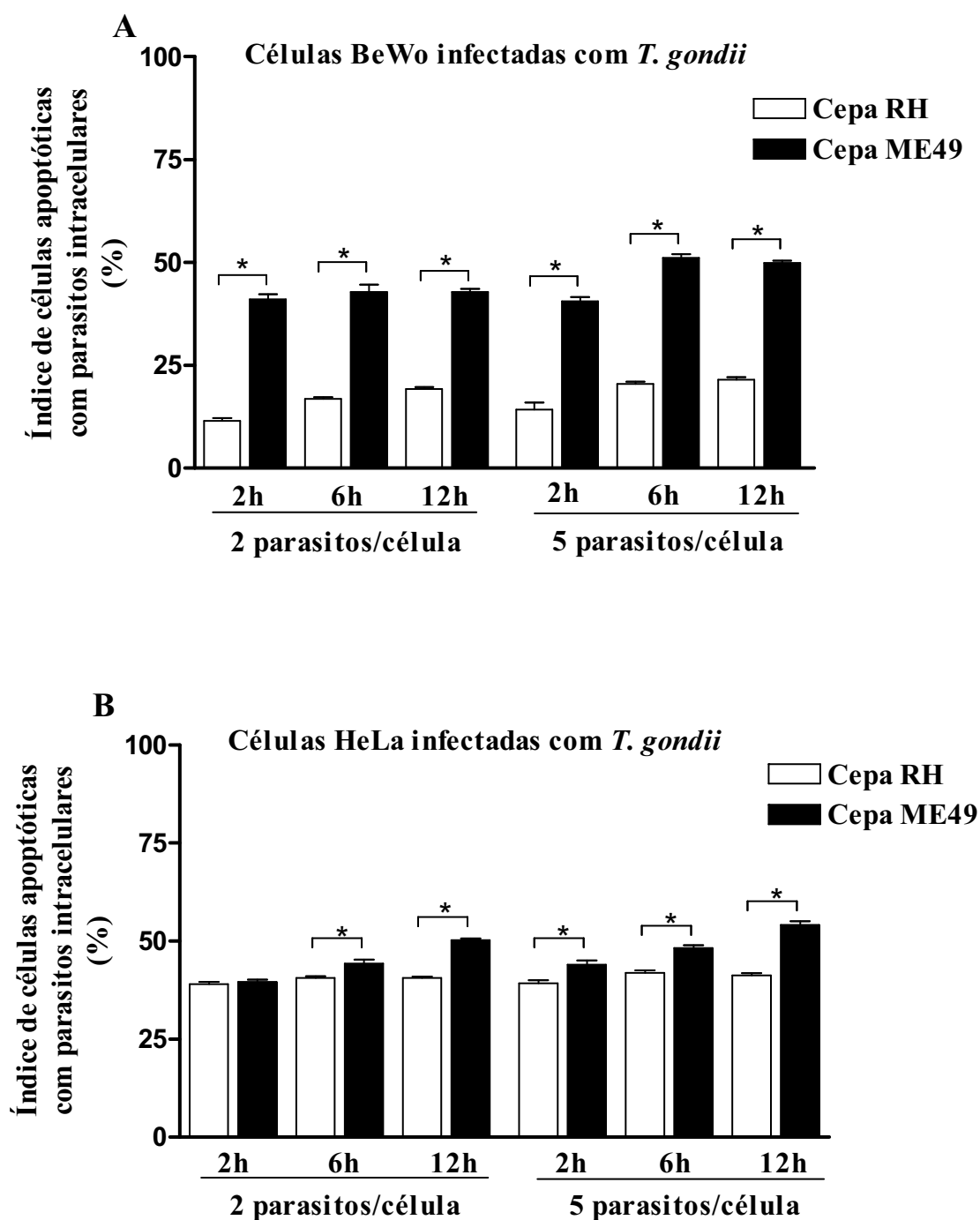
Imunomarcações de células apoptóticas linhagens **BeWo** e **HeLa**, após 12 horas de infecção por *T. gondii*. **a**) células BeWo não infectadas (controle); **b**) células HeLa não infectadas (controle); **c**) células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos/célula); **d**) células HeLa infectadas com a cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos/célula); **e**) células BeWo infectadas com a cepa ME49 (5 parasitos/célula); **f**) células HeLa infectadas com a cepa ME49 (5 parasitos/célula). As imunomarcações de células apoptóticas estão indicadas pelas setas. Coloração por imunohistoquímica com anticorpo M30 utilizando fosfatase alcalina e *fast red naphthol*, contra-coloração com hematoxilina de Meyer. Barras: 35μm

Figura 2



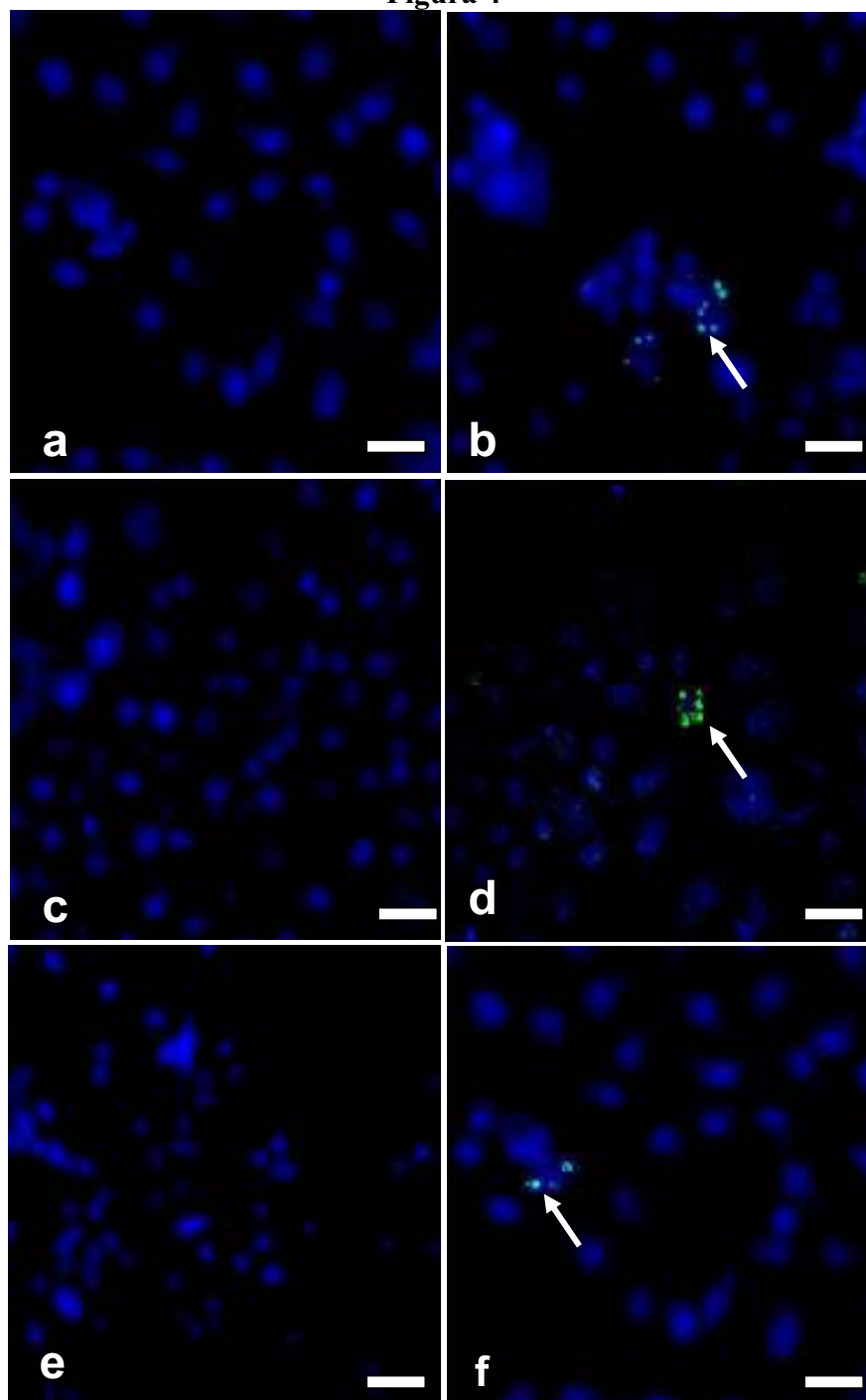
Influência das cepas RH e ME49 de *T. gondii* no índice de apoptose (%) de células **BeWo** (A) e **HeLa** (B), infectadas com as proporções de 2 e 5 parasitos/células (2:1 e 5:1), após 2, 6 e 12 horas de infecção. O índice de apoptose corresponde ao número médio de imunomarcações a cada 100 células examinadas. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata, sendo que as médias foram comparadas pelo teste ANOVA. Observaram-se diferenças estatísticas entre células infectadas com os respectivos controles (*) e entre as proporções de infecção 2:1 e 5:1 (•).

Figura 3



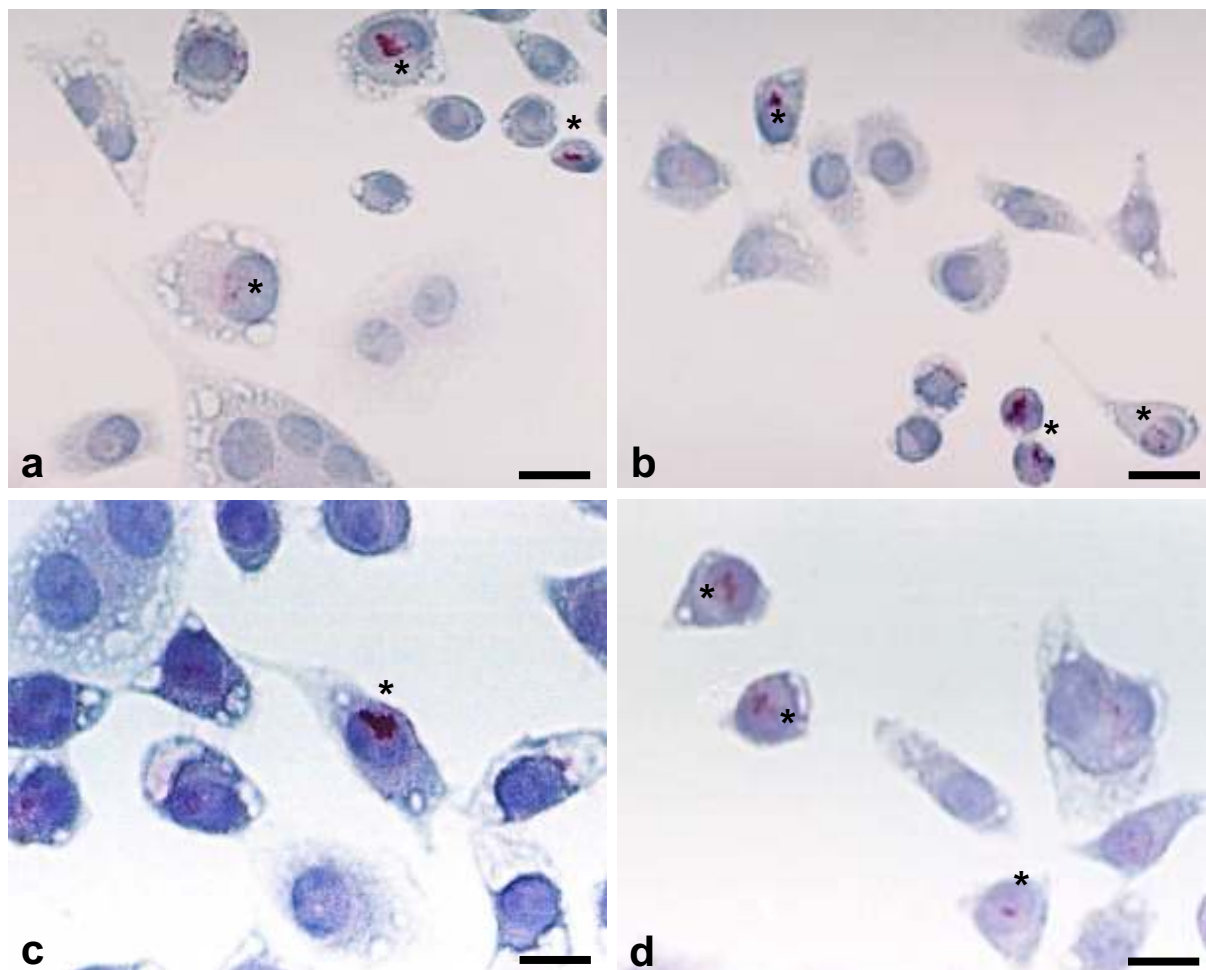
Análise do índice (%) de células apoptóticas com parasitos intracelulares, de células **BeWo** (A) e **HeLa** (B), infectadas com *T. gondii* nas proporções de 2 e 5 parasitos/célula, por 2, 6 e 12 horas de infecção. O índice corresponde ao número médio de células apoptóticas com parasitos intracelulares a cada 100 células infectadas examinadas. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata, sendo que as médias foram comparadas pelo teste ANOVA. Foram observadas diferenças estatísticas entre os índices das células infectadas com a cepa RH e ME49 (*).

Figura 4



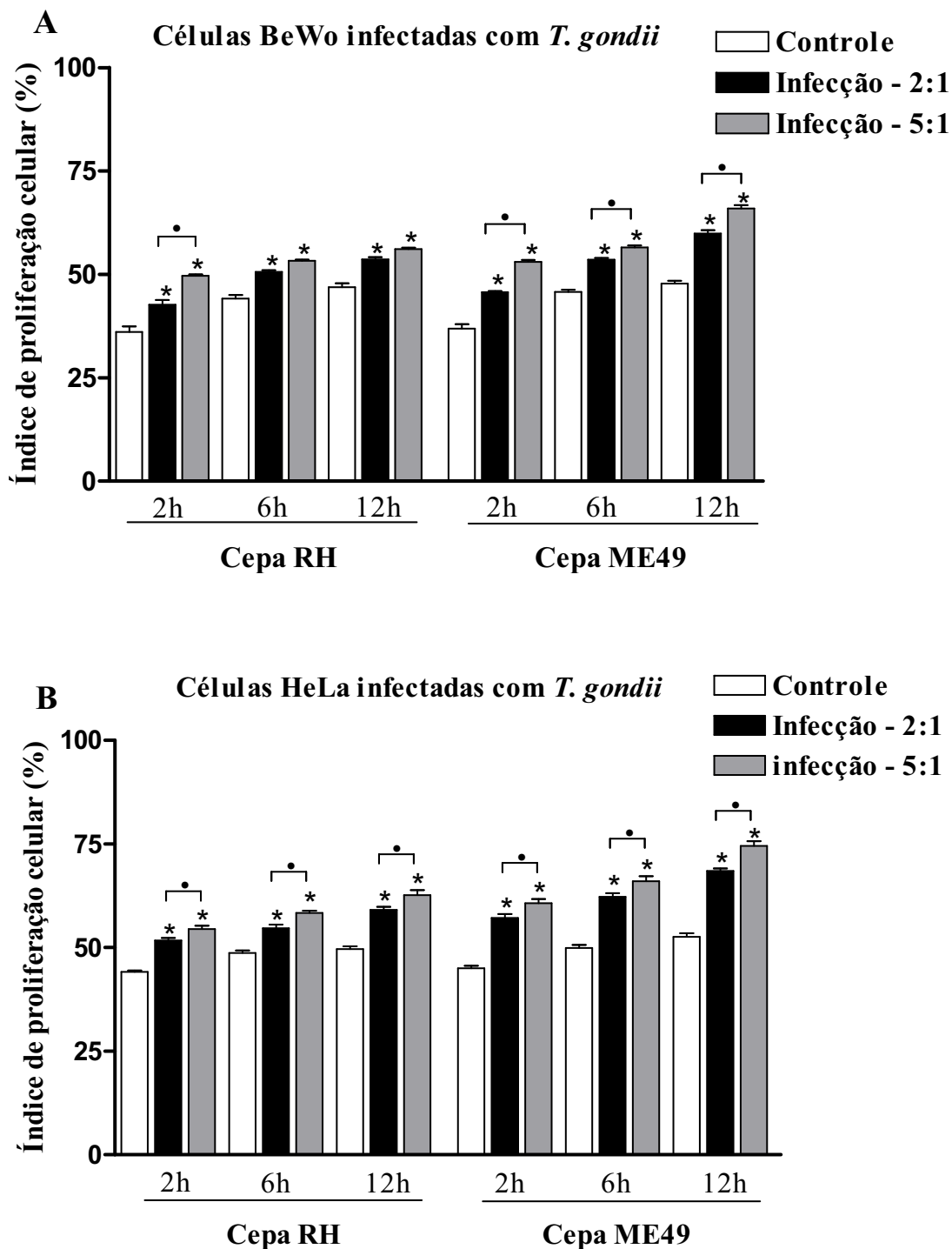
Células trofoblásticas BeWo não infectadas e 12 horas após de infecção com as cepas RH e ME49 de *T. gondii*. A fluorescência azul indica células saudáveis, enquanto que, a fluorescência verde corresponde a presença de caspase 3 ativa. **a)** células saudáveis não infectadas; **b)** caspase 3 ativa em células não infectadas; **c)** células infectadas com a cepa ME49 (5 parasitos por célula); **d)** caspase 3 ativa em células infectadas com a cepa ME49 (5 parasitos por célula); **e)** células infectadas com a cepa RH (5 parasitos por célula); **f)** caspase 3 ativa em células infectadas com a cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos por célula). As fluorescências representando caspase 3 ativa estão indicadas pelas setas. Coloração por fluorescência analisada em microscópio confocal, utilizando DAPI (fluorescência azul) e substrato de caspase 3 NucView 488 (fluorescência verde). Barras 40µm.

Figura 5



Imunomarcações de células em proliferação celular, após 12 horas de infecção. **a)** células BeWo não-infectadas (controle); **b)** células BeWo infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* (5 parasitos/célula); **c)** células HeLa não-infectadas (controle); **d)** células HeLa infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* (5 parasitos/célula). As imunomarcações de células em proliferação celular estão indicadas com asteriscos (*). Coloração por imunohistoquímica com o anticorpo NCL-PCNA utilizando fosfatase alcalina e *fast red naphthol*, contra-coloração com hematoxilina de Meyer. Barras: 35 μ m

Figura 6



Influência das cepas RH e ME49 de *T. gondii* no índice de proliferação celular (%) de células **BeWo** (A) e **HeLa** (B), infectadas com as proporções de 2 e 5 parasitos/células (2:1 e 5:1), após 2, 6 e 12 horas de infecção. O índice de proliferação celular corresponde ao número médio de imunomarcações a cada 100 células examinadas. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata, sendo que as médias foram comparadas pelo teste ANOVA. Observou-se diferenças estatísticas entre células infectadas com os respectivos controles (*) e entre as proporções de infecção 2:1 e 5:1 (•).

9. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and Molecular Immunology**, 5^a ed. Elsevier Saunders, San Francisco, p. 227–31, 2005.

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 of primary infection. **Infect. Immun.**, United States, v. 72, n. 3, p. 1397–401, Mar., 2004.

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

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIA, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**, 2^a ed. Artmed, São Paulo, p. 626–7, 2006.

APLIN, J.D. The cell biological basis of human implantation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.**, England, v. 14, n. 5, p. 757-64, Oct, 2000.

APPLEFORD, P.J.; SMITH, J.E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **Int J Parasitol.**, England, v. 30, n. 11, p. 1187-91, Oct, 2000.

ARNOULT, D. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. **Trends Cell Biol.**, England, v. 17, n. 1, p. 6–12, Nov, 2006.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, United States, v. 281, n. 28, p. 1305–08, Aug, 1998.

ASCHKENAZI, S.; STRASZEWSKI, S.; VERWER, K.M.A.; FOELLMER, H.; RUTHERFORD, T.; MOR, G. Differential regulation and function of the Fas/FasL ligand system in human trophoblast cells. **Biol Reprod.**, United States, v. 66, n. 6, p. 1853-61, Jun, 2002.

BACHMEYER, C.; MOUCHNINO, G.; THULLIEZ, P.; BLUM, L. Congenital toxoplasmosis from a HIV – infected woman as a result of reactivation. **J Infect.**, v.32, n.2, p. 55–7, Feb, 2006.

BALDWIN, R.L.; TRAN, H.; KARLAN, B.Y. Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis. **Gynecol Oncol.**, United States, v. 74, n. 2, p. 265–71, Aug, 1999.

BANNAI, H.; NISHIKAWA, Y.; MATSUO, T.; KAWASE, O.; WATANABE, J.; SUGIMOTO, C.; XUAN, X. Programmed cell death 5 from *Toxoplasma gondii*: A secreted molecule that exerts pro-apoptotic effect on host cells. **Mol Biochem Parasitol.**, Netherlands, v. 159, n. 2, p. 112-20, Jun, 2008.

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

BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Penetrating biological barriers: transepithelial migration by *Toxoplasma*. **Subcell Biochem.**, England, v. 47, p. 198-207, 2008.

BENNETT, W.A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; WHITWORTH, N.S.; BRACKIN, M.N.; HALE, E.; COWAN, B.D. Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. **Early Pregnancy**, v. 3, n. 3, p. 190–8, Sep, 1997.

BERKOWITZ, R.S.; HILL, J.A.; KURTZ, C.B.; ANDERSON, D.J. Effects of products of activated leukocytes (lymphokines and monokines) on the grow of malignant trophoblast cells in vitro. **Am J Obstet Gynecol.**, United States, v. 158, n. 1, p. 199–203, Jan, 1988.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Mol Biol Rev.**, England, v. 64, n. 3, p. 607-23, Sep, 2000.

BOOTHROYD, J.C.; DUBREMETZ, J. Kiss and spit: the dual role of *Toxoplasma* rhoptries. **Nat Rev Microbiol.**, England, v. 6, n.1, p. 79-88, Jan, 2008.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr Opin Microbiol.**, England, v. 5, n. 4, p. 438–42, Aug, 2002.

BOWEN, J.M.; CHAMLY, L.; MITCHELL, M.D.; KEELAN, J.A. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. **Placenta**, England, v. 23, n. 4, p. 239-56, Apr, 2002.

BOYER, K.M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISHER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; MCLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **Am J Obstet Gynecol.**, United States, v. 192, n. 2, p. 564–71, Feb, 2005.

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L.D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Curr Opin Microbiol.**, England, v. 10, n. 6, p. 582-7, Dec, 2007.

BRUNET, J.; PFAFF, A.W.; ABIDI, A.; UNOKI, M.; NAKAMURA, Y.; GUINARD, M.; KLEIN, J. CANDOLFI, E.; MOUSLI, M. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. **Cell Microbiol.**, England, v. 10, n. 4, p. 908-20, Apr, 2008.

CARLSON, B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 84–95, 1996.

CARMEN, J.C.; SOUTHARD, R.C.; SINAI, A.P. The complexity of signaling in host-pathogen interactions revealed by the *Toxoplasma gondii*-dependent modulation of JNK phosphorylation. **Exp Cell Res.**, United States, v.314, n. 20, p.3724-36, Dec, 2008.

CARMEN, J.C.; SINAI, A.P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Mol Microbiol.**, England, v. 64, n. 4, p. 904-16, May, 2007.

CARMEN, J.C.; HARDI, L.; SINAI, A.P. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathways. **Cell Microbiol.**, England, v. 8, n. 2, p. 301-15, Feb, 2006.

CARRUTHERS, V.B. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **Inter J Parasitol.**, England, v. 36, n. 5, p. 595 – 600, May, 2006.

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

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol.**, England, v. 10, n. 1, p. 83-9, Feb., 2007.

CHEN, K.T.; ESKILD, A.; BRESNAHAN, M.; STRAY-PEDERSEN, B.; SHER, A.; JENUM, P.A. Previous maternal infection with *Toxoplasma gondii* and the risk of fetal death. **Am J Obstet Gynecol.**, United States, v. 193, n. 2, p. 443–9, Aug, 2005.

CHURCH, H.J.; APLIN, J.D. BeWo choriocarcinoma cells produce laminin 10. **Biochem J.**, England, v. 1, n. 332 (Pt2), p. 491–8, Jun, 1998.

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

CROCKER, I.P.; COOPER, S.; ONG, S.C.; BAKER, P. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Am J Pathol.**, United States, v.162, n. 2, p. 637–43, Feb, 2003.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; VILLAGGIO, B.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S. Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis.**, England, v. 57, n. 10, p. 573-7, Oct, 1998.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; HIPPE, D.; SCHWARZ, R.T.; CARSTEN, G.; LÜDER, K. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. **Apoptosis**, United States, v.12, n. 4, p. 781-90, Apr, 2007.

DENKERS, E.Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, England, v. 39, n. 3, p. 193-203, Dec, 2003.

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin Microbiol Rev.**, United States, v. 11, n. 4, p. 569-88, Oct, 1998.

DOBROWOLSKI, J.M.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, United States, v. 84, n. 6, p. 933–9, Mar, 1996.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol.**, Netherlands, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec, 2004.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev.**, United States, v. 11, n. 2, p. 267-99, Apr, 1998.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of Animal and Man**, 1^a ed. CRC Press, INC Florida, 1988.

EATON, M.S.; WEISS, L.M.; KIM, K. Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, England, v. 36, n. 1, p. 107-14, Jan, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.**, United States, v. 35, n. 4, p. 495-516, Dec, 2007.

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. **Public Health.**, v.122, n.4, p. 335-53, Apr, 2008.

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

FAN, Y.; BERGMANN, A. Apoptosis-induced compensatory proliferation. The cell is dead. Long live the cell. **Trends Cell Biol.**, England, v. 18, n. 10, p. 467-73, Sep, 2008.

FARHAT, C.K.; CARVALHO, E.S.; CARVALHO, L.H.F.R.; SUCCI, R.C.M. **Infectologia Pediátrica**. 2^a ed. Atheneu, São Paulo, p. 61 –8, 1998.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto – Imunes**. 2^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 278–86, 2001.

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 Infect.**, France, v. 6, n. 2, p. 172–81, Feb, 2004.

FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 147f. Tese (Doutorado) apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2000.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Inst Super Sanità.**, Italy, v. 40, n. 1, p. 71 – 80, 2004.

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukin IL-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, England, v. 21, n. 4, p. 354–60, May., 2000.

GAVRILESCU, L.G.; DENKERS, E.Y. Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, United States, v. 71, n. 5, p. 2577-83, May, 2003.

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

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

GREEN, D.R. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. **Immunol Rev.**, Denmark, v. 193, p. 5-9, Jun, 2003.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann Inst Super Sanità.**, Italy, v. 40, n. 1, p. 67–70, 2004.

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

GUILLERMO, L.V.C.; PEREIRA, W.F.; MEIS, J.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; SILVA, E.M.; KROLL-PALHARES, K.; TAKIVA, C.M.; LOPES, M.F. Targeting caspases in intracellular protozoan infections. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, United States, v. 10, p. 1-30, Sep, 2008.

GUTIERREZ, A.A.; ARIAS, J.M.; GARCIA, L.; MAS-OLIVA, J.; GUERRERO-HERNANDEZ, A. Activation of a Ca²⁺ permeable cation channel by two different inducers of apoptosis in a human prostatic cancer cell line. **J Physiol.**, England, v. 15, n. 517 (Pt1), p. 95–107, May, 1999.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res.**, Germany, v. 301, n. 5-17, Jul, 2000.

HAJJ, H.E.; LEBRUN, M.; FOURMAUX, M.N.; VIAL, H.; DUBREMETZ, J.F. Characterization, biosynthesis and fate of ROP7, a ROP2 related rhopty protein of *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, Netherlands v. 146, n. 1, p. 98–100, Mar, 2006.

HEAZELL, A.E.P.; CROCKER, I.P. Live and let die – regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. **Placenta**, England, v. 29, n. 9, p. 772-83, Sep, 2008.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, England, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct, 2000.

HEUSSLER, V.T.; KUENZI, P.; ROTTENBERG, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **Int J Parasitol.**, England, v. 31, n. 11, p. 1166–76, Sep, 2001.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect.**, United States, v. 8, n. 10, p. 634-40, Oct, 2002.

]

HIPPE, D.; LYTOVCHENKO, O.; SCHMITZ, I.; LUDER, C.G.K. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. **Infect Immun.**, United States, v. 76, n. 7, p. 2905-12, Jul, 2008.

HU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; FRAUNHOLZ, M.; SURAVAJJALA, S.; DILULLO, C.; YATES, J.; ROOS, D.S.; MURRAY, J.M. Cytoskeletal components of an invasion machine-the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, United States, v. 2, n. 2, Feb, 2006.

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J.C.P. Apoptosis and its role in the trophoblast. **Am J Obstet Gynecol.**, United States, v. 195, n. 1, p. 29–39, Jul, 2006.

JAMES, E.R.; GREEN, D.R. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. **Trends Parasitol.**, England, v. 20, n. 6, p. 280-7, Jun, 2004.

JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **Am Fam Physician.**, United States, v. 67, n. 10, p. 2131–8, May, 2003.

JONES, J.L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstet Gynecol Surv.**, United States, v. 56, n. 5, p. 296-305, May, 2001.

JONES, R.L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J.; SALAMONSEN, L.A. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, England, v.132, n. 2, p. 217-32, Aug, 2006.

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

KAPONIS, A.; SKYRIAS, A.; ZAGORIANAKOU, N.; GEORGIU, I.; PASSA, V.; PARASKEVAIDIS, E.; MAKRYDIMAS, G. Coelomic cells show apoptosis via Fas/FasL system: a comparative study between healthy human pregnancies and missed miscarriages. **Hum Reprod.**, England, v. 33, n. 5, p. 1159-69, Mar, 2008.

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am J Med.**, United States, v. 118, n. 3, p. 212–6, Mar, 2005.

KIM, J.; AHN, M.; JUN, H.; JUNG, J.; RYU, J.; MIN, D. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF- κ B activation. **Yonsei Med J.**, Korea, v. 47, n. 6, p. 862-9, Dec, 2006.

KIM, K.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int J Parasitol.**, United States, v. 34, n. 3, p. 423-32, Mar, 2004.

LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell Death Differ.**, England, v. 15, n. 9, p. 1339-49, Sep, 2008.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V.B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol Life Sci.**, Switzerland, v. 65, n. 12, p. 1900-15, Jun, 2008.

LANG, C.; BROB, U.; CARSTEN, G.; LUDER, K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.**, Germany, v. 100, p. 191–203, Jan, 2007.

LARSEN, W. J. **Human Embryology**. New York (USA): Churchill Livingstone, p. 435–47, 1993.

LAVINE, M.D.; ARRIZABALAGA, G. Induction of mitotic-S-phase of host cell and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. **Mol Biochem Parasitol.**, Netherlands, artigo “in press”, doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.014. Dec, 2008.

LEE, J.; CHOI, B.; CHO, C.; HILL, J.A.; BACK, K.; KIM, J. Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of Th1 immunity. **Fertil Steril.**, United States, v. 83, n. 4, p. 1047-9, Apr, 2005.

LERICHE, M.A; DUBREMETZ, J.F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host-cell invasion. **Parasitol Res.**, Germany, v. 76, n. 6, p. 559-62, 1990.

LEVY, R.; NELSON, D.M. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. **Placenta**, England, v. 21, n. 1, p. 1–13, Jan, 2000.

LI, L.W.; SHAO, Z.X.; YAN, J. Change of cytoskeleton and variance of Ca^{2+} in cultured cells during the invasion of *Toxoplasma gondii*. **Zhongguo JiSheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, China, v. 24, n. 4, p. 251–6, Aug, 2006.

LYCKE, E.; CARBERG, K.; NORRBY, R. Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host-cell: function of the penetration enhancing factor *Toxoplasma*. **Infect Immunol.**, United States, v. 11, n. 4, p. 853-61, 1975.

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

LÜDER, C.G.K.; GROSS, U.; LOPES, M. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends Parasitol.**, England, v. 17, n. 10, p. 480–6, Oct, 2001.

LÜDER, C.G.K.; STANWAY, R.R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V.T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int J Parasitol.**, England, v. 39, n. 2, p. 163-73, Jan, 2009.

LUPPI, P. How immune mechanism are affected by pregnancy. **Vaccine**, Netherlands, v. 21, n. 24, p. 3352–7, Jul., 2003.

MANIATI, E.; POTTER, P.; ROGERS, N.J.; MORLEY, B.J. Control of apoptosis in autoimmunity. **J Pathol.**, England, v. 215, n. 2, p. 190-8, Jan, 2008.

MCCABE, R.E.; LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Effect of murine interferon-gamma on murine toxoplasmosis. **J Infect Dis.**, United States, v.150, p. 961-2, Dec, 1984.

MCLEOD, R.; MACK, D.; BROWN, C. *Toxoplasma gondii* – new advances in cellular and molecular biology. **Exp Parasitol.**, United States, v. 72, n. 1, p. 109–21, Jan, 1991.

MOLESTINA, R.E.; GUENDY, N.; SINAI, A.P. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. **Cell Microbiol.**, England, v. 10, n. 5, p. 1153-65, May, 2008.

MOLESTINA, R.E.; PAYNE, M.; COOPENS, I.; SINAI, A.P. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Sci.**, England, v.1, n. 116, p. 4359-71, Nov, 2003.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet.**, England, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, Jun, 2004.

MORDUE, D.G.; MONROY, F.; REGINA, M.L.; DINARELLO, C.A.; SIBLEY, L.D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J Immunol.**, United States, v. 167, n. 8, p. 4574-84, Oct, 2001.

NELSON, N.M.; JONES, A.R.; CARMEN, J.C.; SINAI, A.P.; BURCHMORE, R.; WASTLING, J.M. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, United States, v. 76, n. 2, p. 828-44, Feb., 2008.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**, 11^a ed. Atheneu, São Paulo, p. 147-56, 2005.

OLIVEIRA, J.G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.D.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, G.L.S.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta.**, England, v. 27, n. 6-7, p. 691–98, Jun-Jul, 2006.

OPFERMAN, J.T.; KORSMEYER, S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nat Immunol.**, United States, v. 4, n. 5, p. 410–5, May, 2003.

OW, Y.P.; GREEN, D.R.; HAO, Z.; MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat Rev Mol Cel Biol.**, England, v. 9, n. 7, p. 532-42, Jul, 2008.

PATTILLO, R.A.; HUSSA, R.O.; RUCKERT, A.C.; KURTZ, J.W.; CADE, J.M.; RINKE, M.L. Human chorionic gonadotropin in BeWo trophoblastic cells after 12 years in continuous culture: retention of intact human chorionic gonadotropin secretion in mechanically versus enzyme-dispersed cells. **Endocrinology**, United States, v. 105, n. 4, p. 967–74, Oct, 1979.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal.**, Netherlands, v.12, n.3, p. 215-23, Jun, 2007.

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

PRIGIONE, I.; CHIESA, S.; TAVERNA, P.; CECCARELLI, R.; FRULIO, R.; MORANDI, F.; BOCCA, P.; CESBRON-DELAUW, M.; PISTOLA, V. T cell immune responses to *Toxoplasma gondii* in pregnant women with primary toxoplasmosis. **Microbes Infect.**, France, v. 8, n. 2, p. 552–60, Feb, 2006.

RADKE, J.R.; STRIEPEN, B.; GUERINI, M.N.; JEROME, M.E. BEHNKE, M.S. LIBERATOR, P.; WHITE, M.W. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. **PLoS Pathog.**, United States, v. 2, n. 10, p. 964-74, Oct, 2006.

RAJASHEKHAR, G.; LOGANATH, A.; ROY, A.C.; MONGELLI, J M. Resistance to Fas-mediated cell death in BeWo and NJG choriocarcinoma cell lines: implications in immune privilege. **Gynecol Oncol.**, United States, v. 91, n. 1, p. 89–100, Oct, 2003.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. **Am J Pathol.**, United States, v. 157, n. 5, p. 1415-30, Nov, 2000.

REMINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, United States, v. 42, n. 3, p. 941–5, Mar, 2004.

REMINGTON, 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.

REY, L. **Parasitologia**, 2^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

RANGO, U.V. Fetal tolerance in human pregnancy – A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunol Lett.**, Netherlands, v. 115, n.1, p. 21-32, Jan, 2008.

ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clin Microbiol Rev.**, v. 14, n. 3, p. 476-88, Jul, 2001.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod Toxicol.**, United States, v. 21, n. 4, p. 458-72, May, 2006.

RUPINDER, S.K.; GURPREET, A.K.; MANJEET, S. Cell suicide and caspases. **Vascul Pharmacol.**, United States, v. 46, n. 6, p. 383-93, Jun, 2007.

SAEJI, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends Parasitol.**, England, v. 21, n. 10, p. 477-81, Oct, 2005.

SENEGAS, A.; VILLARD, O.; NEUVILLE, 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. **Inter J Parasitol.**, England, artigo "in press", doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.009, Sep, 2008.

SIBLEY, L.D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Science**, United States, v. 304, p. 248 – 253, Apr, 2004.

SINAI, A.P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Subcell Biochem.**, England, v. 47, p. 155-64, Jul, 2008.

SINAI, A.P.; PAYNE, T.M.; CARMEN, J.C.; HARDI, L.; WATSON, S.J.; MOLESTINA, R.E. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, England, v. 34, n. 3, p. 381–91, Mar, 2004.

SOMERSET, D.A.; ZHENG, Y.; KILBY, M.D.; SANSOM, D.M.; DRAYSON, M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology**, England, v. 112, n. 17, p. 2117-28, Sep, 1997.

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. **Rev Soc Brás Med Trop.**, Brazil, v. 36, n. 4, p. 483-91, Jul-Aug, 2003.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends Parasitol.**, England, v. 22, n. 3, p. 137 – 42, Mar, 2006.

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

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, England, v. 9, n. 3, p. 231-41, Mar, 2008.

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

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDÈ, M.; PINON, J.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends Parasitol.**, England, v. 20, n. 4, p. 160–2, Apr, 2004.

VUTOVA, P.; WIRTH, M.; HIPPE, D.; GROSS, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, I.; LÜDER, C.G.K. *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. **Cell Microbiol.**, England, v.9, n. 6, p. 1556-70, Jun, 2007.

YAP, G.S.; SHAW, M.H.; LING, Y.; SHER, A. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. **Microbes Infect.**, France, v. 8, p. 1174–8, Jan, 2006.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host cell resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol Lett.**, Netherlands, v. 119, n. 1-2, p. 17-21, Aug, 2008.

YAROVINSKY, F.; SHER, A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. **Inter J Parasitol.**, England, v. 36, p. 255 – 259, Jan, 2006.

ZENCLUSSEN, A.C. Regulatory T cells in pregnancy. **Sem Immunol.**, Germany, v. 28, n. 1, p. 31-9, Aug, 2006.