



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Análise histopatológica e expressão dos receptores tipo *Toll 2* e *4* na placenta de camundongos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii* em diferentes terços gestacionais

Taynan Dulce da Silva Rosa

SÃO LUÍS – MA

2019

TAYNAN DULCE DA SILVA ROSA

Análise histopatológica e expressão receptores tipo *Toll 2* e *4* na placenta de camundongos experimentalmente infectadas com *Toxoplasma gondii* em diferentes terços gestacionais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho
Neta

Co-orientadores: Profa. Dra. Tânia Zaverucha do Valle e Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza

SÃO LUÍS – MA

2019

TAYNAN DULCE DA SILVA ROSA

Análise histopatológica e expressão dos receptores tipo *Toll 2* e *4* na placenta de camundongos experimentalmente infectadas com *Toxoplasma gondii* em diferentes terços gestacionais

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta, Dsc – UEMA

(Orientadora)

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

1º membro

Dra. Tânia Zaverucha do Valle

2º membro

Ao meu pai, Claudio da Silva Rosa Neto.
Eu sou o que sou graças a você meu pai, meu herói.
(in memoriam)

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Salmos 23:4

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus. Pai, tudo o que tenho e que sou é graças a ti.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Alcina, minha mãe científica, obrigada por toda confiança depositada em mim, sem seus ensinamentos eu não estaria aqui hoje. Obrigada por tudo, por me acolher no laboratório desde o começo da graduação e me ajudar no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Fernando, que me recebeu de braços abertos na sua família científica, obrigada por todos os momentos juntos, por sempre me colocar pra cima e também por enxugar minhas lágrimas quando eu precisei de um ombro amigo.

À minha co-orientadora Tânia, quem estava comigo todos os dias na Fiocruz e sofria junto comigo quando cada fêmea paria, assim com comemorava quando nosso n aumentava. Obrigada por tudo, por cada ensinamento, tudo foi de grande importância pra mim.

Meu agradecimento especial a Kátia Calabrese por abrir as portas do laboratório e estar sempre disponível para o que precisássemos. À Celeste, obrigada por todo carinho, por toda a ajuda, uma mãezona que conheci e que vou levar pra sempre comigo.

À professora Ana Lúcia e o professor Auricélio por toda ajuda disponibilizada para execução do projeto.

Às amigas Larissa, Ellainy, Ingrid, Hanna, Dani e Scarleth, obrigada por todo carinho, amizade e palavras de força. Com a ajuda de vocês tudo se tornou mais leve. Obrigada pelo jeitinho de cada uma, vocês são muito importantes pra mim.

Aos amigos do LIMP, Flávia, Sandy, Yasmin, Juan, Mariana e Luzilene, os dias ao lado de vocês eram sempre mais divertidos. Obrigada pela amizade de cada um.

Aos amigos que Deus colocou na minha vida na hora certa, João Silva e Thaynara Flor. Obrigada por cada palavra de força, vocês se tornaram pessoas muito importantes na minha vida, obrigada pela amizade e companheirismo sempre, mesmo com os muitos quilômetros de distância entre nós.

Às irmãs cajazeiras, Renata Mondego, Lucélia e Ana Eliza. Obrigada por ter dividido a vida de vocês comigo e por terem me abraçado de uma maneira incrível, sei que não sou uma pessoa fácil de lidar, mas com vocês aprendi a ser mais humana e me importar mais com os outros. Amo vocês e aproveito para lembrá-las que eu ainda continuo sendo a única ajuizada da casa kkk.

Às minhas amigas que a universidade me deu e que vou levar pra vida toda, Carol Torres, Thaís Lara e Julie, mesmo de longe continuamos sendo o que éramos

antes, obrigada pela amizade de vocês e por estarem presente sempre. À minha amiga e irmã Letícia, obrigada por ser do jeitinho que você é. Amo todas vocês.

Aos meus amigos Thaís Bastos e Pablo Sousa, que encararam o mestrado junto comigo. Obrigada pelo companheirismo sempre, tudo foi mais fácil com vocês ao meu lado.

Ao meu irmão Ruan, meu principal incentivador. Como ele mesmo fala, a distância só nos aproximou ainda mais, eu te amo de uma forma inexplicável. Obrigada por não me deixar fraquejar nos momentos difíceis que passamos juntos, por toda preocupação e todo apoio. Te amo!

Minha mãe, Maria Cleudes, exemplo de mulher, garra e força. Meu espelho, minha companheira, a pessoa mais importante na minha vida. Espero um dia ser um terço da mulher que a senhora é, obrigada por nunca me deixar cair, por sempre me incentivar, principalmente no momento que quis largar tudo, a senhora me deu forças e disse vai lá filha, vai dar tudo certo. Eu te amo mais que tudo!

E por último, pelo fato de ser o mais difícil de escrever, gostaria de agradecer ao meu pai Claudio Rosa, que nos deixou tão cedo, escrevo já com o rosto inchado de tanto chorar, exatamente como seria se fosse o senhor no meu lugar. Meu pai, meu herói, obrigada por tudo, por todos os momentos que passamos na vida, por me ensinar a ser humilde e manter a cabeça erguida sempre. Não tenho mais palavras para descrever o quanto és importante pra mim. Sei que de onde o senhor está sempre irá me proteger e guiar pelo melhor caminho, não me deixando desistir dos meus sonhos, por mais difíceis que sejam.

Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que a fez tão importante.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Análise histopatológica e expressão dos receptores tipo *Toll* 2 e 4 na placenta de camundongos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii* em diferentes terços gestacionais

As falhas na concepção como aborto, morte fetal e defeitos congênitos podem estar associadas a agentes infecciosos e, nesse contexto, *Toxoplasma gondii* possui um papel de grande destaque. Dada a importância da placenta na prenhez e a infecção por *T. gondii* durante a gestação, nós padronizamos um modelo murino prenhe oralmente infectadas com 20 cistos teciduais da cepa ME-49 de *T. gondii*, para analisar histopatologicamente e avaliar a expressão de TLR 2 e 4 na placenta, em três diferentes momentos da gestação. Foram realizados 19 ciclos de acasalamento, totalizando 26 fêmeas prenhes divididas em 4 grupos experimentais; (G1) grupo controle com fêmeas prenhes e não infectadas; (G2) fêmeas prenhes inoculadas no primeiro terço gestacional; (G3) fêmeas prenhes inoculadas no segundo terço gestacional, e (G4) fêmeas prenhes inoculadas no terceiro terço de gestação. Nas análises histopatológicas da placenta e do cérebro das fêmeas foi possível observar infiltrado inflamatório e áreas de necrose principalmente nos animais infectados no segundo terço de gestação. Foi possível detectar o DNA de *T. gondii* através de PCR convencional no cérebro de apenas uma fêmea infectada no primeiro terço gestacional, assim como a expressão de TLR 2 e 4 na placenta foi mais evidenciado nos animais infectados no início da gestação. Desta forma, evidenciamos que o modelo murino é eficiente para estudos relacionados com a toxoplasmose congênita e que as alterações observadas histopatologicamente são dependentes do tempo de infecção.

Palavras-chave: Toxoplasmose, placenta, qPCR, *Toll*.

ABSTRACT

Histopathological analysis and expression of Toll 2 and 4 receptors in the placenta of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii* in different gestational thirds

Failures in conception such as abortion, fetal death and congenital defects may be associated with infectious agents and, in this context, *Toxoplasma gondii* plays a major role. Given the importance of the placenta in pregnancy and *T. gondii* infection during gestation, we standardized a murine model pregnant orally infected with 20 tissue cysts of the *T. gondii* strain ME-49, to analyze histopathologically and to evaluate the expression of TLR 2 and 4 in the placenta, in three different moments of gestation. 19 mating cycles were performed, totalizing 26 pregnant females divided into 4 experimental groups; (G1) control group with pregnant and uninfected females; (G2) pregnant females inoculated in the first gestational third; (G3) pregnant females inoculated in the third gestational third, and (G4) pregnant females inoculated in the third third of gestation. In histopathological analyzes of the placenta and the brains of the females it was possible to observe inflammatory infiltrate and areas of necrosis, especially in infected animals in the second third of gestation. It was possible to detect *T. gondii* DNA by conventional PCR in the brain of only one infected female in the first gestational third, as well as the expression of TLR 2 and 4 in the placenta was more evidenced in infected animals at the beginning of gestation. In this way, we demonstrated that the murine model is efficient for studies related to congenital toxoplasmosis and that the changes observed histopathologically are dependent on the time of infection.

Keywords: Toxoplasmosis, placenta, qPCR, *Toll*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| <p>Figura 1. Ciclo de vida do protozoário <i>T. gondii</i>. Os felídeos, hospedeiros definitivos (HD) adquirem a infecção ao ingerirem oocistos liberados nas fezes por outros, ou cistos teciduais oriundos de hospedeiros intermediários (HI). Os oocistos liberados nas fezes, ao entrar em contato com umidade e oxigênio esporulam e se tornam infectantes. (1). Por sua vez, animais de produção, (2), podem contaminar-se ao ingerir oocistos ambientais ou cistos tissulares. No HI, o parasito realiza o ciclo assexuado, que culmina com a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos, fonte de infecção para o consumo humano, também susceptível de adquirir a infecção por meio da ingestão de alimentos contaminados. Outra forma de infecção ocorre através da passagem de taquizoítos através da via transplacentária (3).....21</p> | 21 |
| <p>Figura 2. Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> obtido a partir de cérebro de camundongos C57BL/6. Aumento 40x.....33</p> | 33 |
| <p>Figura 3. Delineamento experimental de acasalamento de camundongos C57BL/6 e infecção por <i>T. gondii</i>.....34</p> | 34 |
| <p>Figura 4. Fluxograma de acasalamento e inoculação de <i>T. gondii</i> em camundongos C57BL/6.....39</p> | 39 |
| <p>Figura 5. Avaliação do peso corporal das fêmeas C57BL/6 após os ciclos de acasalamento. Dados representam média ± desvio padrão de experimento realizado ao menos em triplicata. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 quando comparado com o dia 1, ou entre os colchetes, após análise de variância e teste de comparação múltipla de Tukey.....40</p> | 40 |
| <p>Figura 6. Imagem representativa de alterações inflamatórias na placenta de camundongos fêmeas C57BL/6 infectadas com <i>T. gondii</i> ME-49 no segundo terço da gestação. Área focalmente extensa de necrose de coagulação (seta preta) moderada associada a áreas multifocais de infiltrado inflamatório neutrofílico em moderada quantidade (setas brancas) na camada labiríntica da placenta. No detalhe é possível observar moderada quantidade de neutrófilos (cabeças de setas). Hematoxilina e Eosina (400X). Barra: 50 µm.....42</p> | 42 |

Figura 7. Escore de lesões inflamatórias na placenta de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* ME-49 ao longo da gestação. Médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. *P < 0.05.....43

Figura 8. Imagens representativas das alterações microscópicas no encéfalo de camundongos fêmeas C57BL/6 infectadas com *T. gondii* ME-49 em diferentes momentos da gestação (todas as micrografias são do segundo terço). (A) Área focal de encefalite necrotizante não supurada moderada na substância cinzenta do córtex cerebral (seta). (B) Vênula no parênquima cerebral rodeada por 2 a 3 camadas de células inflamatórias mononucleares, caracterizando o manguito perivascular na substância cinzenta do córtex cerebral (seta). No detalhe é possível observar vacuolização moderada do neurópilo (cabeça de seta). (C) Área focalmente extensa de gliose moderada na substância cinzenta do córtex cerebral (seta). No detalhe é possível observar oligodendrócitos (cabeças de setas) ao redor de um neurônio, caracterizando uma área de satelitose moderada. Hematoxilina e Eosina (400X). Barra: 50 µm.....45

Figura 9. Escores de lesões no encéfalo de camundongos fêmeas C57BL/6 inoculadas com *T. gondii* ME-49 ao longo da gestação. Médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. *P < 0.05.....46

Figura 10. Expressão de TLR na placenta de camundongos C57BL/6 prenhes e inoculados com *T. gondii* em diferentes terços de gestação. Quantificação relativa de TLR2 (A) e TLR4 (B) normalizado com o gene endógeno RPLP0 (ribosomal protein lateral stalk subunit P0). Dados representam média ± desvio padrão (n≥13). *p>0,001 quando comparado com o controle, ou entre colchetes, após análise por Kruskal-Wallis e teste comparação múltipla de Dunn.....51

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Lista de genes e iniciadores utilizados no qRT-PCR..... | 37 |
|--|----|

LISTA DE SIGLAS

APC - Célula Apresentadora de Antígeno

C57BL/6 - Linhagem de Camundongos

CD4⁺ - *Cluster of Differentiation* 4 – Grupamento de diferenciação tipo 4

CD8⁺ - *Cluster of Differentiation* 8 – Grupamento de diferenciação tipo 8

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar

DC - Célula Dendrítica

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

HLA - Complexo Antígeno Leucocitário Humano

HLA de classe I - Complexo Antígeno Leucocitário Humano Classe I

HLA de classe II - Complexo Antígeno Leucocitário Humano Classe II

HLA de classe III - Complexo Antígeno Leucocitário Humano Classe III

ICAM-1- Moléculas de Adesão Intercelular

LTβ - Linfotoxina beta

ME-49 - Cepa de *Toxoplasma gondii*

MHC-I - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I

MyD88 - Molécula Adaptadora Fator de Diferenciação Mieloide 88

NF-κB - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NK - Células *natural killer*

NKG2D - Receptor de Proteína Transmembrana Células *Natural Killer*

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PMNs - Leucócitos Polimorfonucleares

RT-qPCR – Transcriptase Reversa seguida de PCR Quantitativa

RNA - Ácido Ribonucleico

TLRs - Receptores do tipo *Toll*

TNF α - Fator de Necrose Tumoral Alpha

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> | 19 |
| 2.2 Resposta Imunológica durante a infecção por <i>T. gondii</i> | 22 |
| 2.3 Placenta | 24 |
| 2.4 Toxoplasmose Congênita e Resposta Imunológica | 27 |
| 2.5 Receptores tipo <i>Toll</i> | 28 |
| 3. OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 Geral..... | 31 |
| 3.2 Específicos..... | 31 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 Considerações éticas | 32 |
| 4.2 Animais | 32 |
| 4.3 Obtenção dos cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> | 32 |
| 4.4 Delineamento experimental: acasalamento, detecção de prenhez, número amostral e infecção | 33 |
| 4.5 Histopatologia..... | 34 |
| 4.6 Extração de DNA | 35 |
| 4.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... | 35 |
| 4.8 Extração de RNA e Síntese de cDNA | 36 |
| 4.9 Quantificação da expressão gênica de TLR2 e 4 por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)..... | 37 |
| 4.10 Análise Estatística | 37 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 6. CONCLUSÃO | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma antropozoonose distribuída mundialmente, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que acomete diversas espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o homem (DUBEY, 2010; TENTER et al., 2000).

A infecção por *T. gondii* possui grande importância na saúde pública devido às consequências decorrentes desta enfermidade, principalmente em pacientes imunodeprimidos e imunocomprometidos (LANG; GROSS; LÜDER, 2007). A infecção primária em gestantes e, conseqüentemente, a infecção do feto por via transplacentária, particularmente durante o primeiro trimestre de gestação, pode causar sérios danos ao feto, tais como lesões oculares, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais, alterações psicomotoras e retardo mental, além de levar ao aborto ou morte fetal (SILVA et al., 2006; RORMAN et al., 2006). Entretanto, o mecanismo que explica como a infecção por *T. gondii* induz tais anormalidades durante a gestação não foi completamente elucidado.

Em humanos, a toxoplasmose congênita e a transmissibilidade materna-fetal estão diretamente relacionados ao período em que a mãe é infectada: a transmissão vertical é menos frequente no primeiro trimestre (2-15%), embora comumente esteja associada a aborto; no segundo trimestre, a taxa de transmissão vertical aumenta e a manifestação clínica está associada ao nascimento prematuro ou graves alterações congênitas, incluindo alterações nervosas e/ou oftalmológicas; no terceiro trimestre de gestação, a taxa de infecção fetal é de 50-80%, geralmente assintomáticos, mas podem desenvolver alterações neurológicas, oftalmológicas e auditivas ao longo da vida (GRAS et al., 2005).

A resposta imunológica inicialmente é desencadeada pelo reconhecimento inicial de moléculas associadas a microrganismos, genericamente descritas como PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), pela habilidade do sistema imunológico em reconhecer e distinguir moléculas próprias de moléculas não-próprias, através de receptores de padrões moleculares (PRR) expressos nas células do hospedeiro (SILVA et al., 2012). Dentre esses receptores, a família dos receptores do tipo *Toll* (TLR) é a mais bem estudada e caracterizada. A importância de TLRs na imunidade inata foi descrita pela primeira vez em *Drosophila* sp. e, posteriormente, descoberto um homólogo deste receptor (MEDZHITOV et al., 1997), possuindo um total de 14 membros distintos identificados, sendo 12 descritos em

camundongos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Frente à infecção por *T. gondii*, as células dendríticas e os macrófagos desencadeiam a liberação da citocina pró-inflamatória IL-12 através da estimulação de TLRs (LANG; GROSS; LÜDER, 2007). Dentro desta família, o TLR2 e o TLR4 estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra *T. gondii*, atuando no reconhecimento de moléculas de taquizoítos e trabalhando em conjunto com outros receptores para resistência inata e desenvolvimento de imunidade adquirida específica para este protozoário, demonstrando, assim, a importância desses receptores na patogênese da toxoplasmose (MUN et al., 2003; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). No entanto, o perfil de expressão dos receptores da família dos TLRs na placenta ao longo da gestação ainda não foi estudado.

Estudos têm sido desenvolvidos utilizando modelos animais para o entendimento da patogênese da toxoplasmose, como também teste de drogas e cepas vacinais (BRESCHIANI et al., 2001; COUPER et al., 2003; LETSCHER-BRU et al., 2003; CABAÑAS-CORTES et al., 2009). Para o estudo da toxoplasmose congênita, a utilização de modelos animais como ratos (VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016), camundongos (PARKER; ROBERTS; ALEXANDER, 1991; COUTINHO, 2010; FRANCO et al., 2011), porquinho da índia (FLORI et al., 2002) e coelhos (FILHO et al., 2001), se dá devido à similaridade da infecção e da resposta imunológica do hospedeiro comparado com a infecção natural em humanos, aliado ao fato de que a placenta dos roedores possui estreita semelhança morfológica com a placenta humana (DARCY; ZENNER, 1993).

Dentre os agentes infecciosos causadores de falhas na concepção, o *T. gondii* é apontado como um dos principais responsáveis por abortamento em animais e seres humanos (RORMAN et al., 2006). Devido ao importante papel da placenta na prevenção de doenças e proteção ao feto, o conhecimento da cinética da resposta desta estrutura durante a infecção por *T. gondii* é crucial para a compreensão das perdas consequentes na toxoplasmose congênita. Nesse contexto, tornam-se necessários estudos que contemplem o complexo materno-fetal-parasito, assim como tracem um paralelo biológico confiável e controlado usando um modelo experimental que se assemelha à toxoplasmose congênita em humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, agente causador da toxoplasmose é um parasito intracelular obrigatório com capacidade de infectar o homem e diversas espécies de vertebrados. Além disso, é considerado um dos mais abundantes parasitos eucariontes relatados em humanos (TENTER et al., 1988; 2000). Foi descrito pela primeira vez em 1908, simultaneamente por Nicolle e Mancaeux no Instituto Pasteur na Tunísia em um roedor silvestre africano denominado *Ctenodactylus gundi*, e por Splendore no Brasil, que descreveu o parasito em um coelho no estado de São Paulo (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Apesar do isolamento do agente no início do século, apenas na década de 70 foram descritas a sua natureza coccidiana, bem como seus hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970).

Este protozoário pertence ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidica, Subordem Eimeriida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii*, sendo esta espécie de protozoário a única representante do gênero *Toxoplasma* (TENTER et al., 2000).

Apresenta ciclo de vida heteroxênico, se desenvolvendo em hospedeiros definitivos (forma sexuada), os quais estão presentes os felídeos domésticos e selvagens e em hospedeiros intermediários (forma assexuada) representados por aves e diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem (DUBEY et al. 1970; LÜDER et al. 2001; DUBEY, 2004). Possui três formas evolutivas distintas, cada uma com suas características morfológicas: taquizoítos, bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (presentes no interior de oocistos) (DUBEY et al., 1970; DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A transmissão pode ocorrer por ingestão de oocistos em água ou alimentos contaminados, pela ingestão de bradizoítos presente em carne crua ou malcozida ou pela transmissão de taquizoítos pela via transplacentária, transfusão de leucócitos, transplante de órgãos, ingestão de leite caprino não pasteurizado ou em acidentes laboratoriais (DUBEY; BEATTIE, 1988). A via oral é a principal forma de infecção por *T. gondii* (LIESENFELD,

2002). Após a ingestão, o parasito invade a mucosa gastrointestinal, (COHEN; DENKERS, 2014), multiplica-se nas células epiteliais (BARRAGAN; SIBLEY, 2003) e se dissemina através do sangue e da linfa para todos os tecidos do hospedeiro (COURRET et al., 2006).

O ciclo biológico completo do parasito é constituído por duas fases: enteroepitelial e extraintestinal. O ciclo enteroepitelial (fase sexuada) se desenvolve exclusivamente no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (felídeos domésticos e selvagens), produzindo oocistos que são excretados nas fezes e esporulam no ambiente. O ciclo extraintestinal (fase assexuada) ocorre tanto nos hospedeiros intermediários como nos definitivos, nesta fase encontram-se as formas de taquizoítos e bradizoítos (DUBEY, 1994; 1997).

Os felídeos excretam os oocistos de *T. gondii* nas fezes, que em contato com oxigênio e umidade, amadurecem entre dois a cinco dias produzindo no seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Após se tornarem maduros passam a ser infectantes para o homem e outros animais (Figura 1) (CLEARY et al, 2002; MAROBIM et al, 2004). Após a ingestão dos oocistos esporulados ocorre a liberação dos esporozoítos, seguido da conversão para taquizoítos e intensa multiplicação dos mesmos. Posteriormente ocorre o rompimento das células hospedeiras e penetração em outros tipos celulares, com a formação de vacúolos parasitóforos. Nestes vacúolos ocorrem sucessivas divisões, originando novos taquizoítos, que, novamente, irão romper a célula hospedeira e infectar novas células, caracterizando a fase proliferativa do ciclo, responsável pelas manifestações da fase aguda da doença (NEVES, 2003).

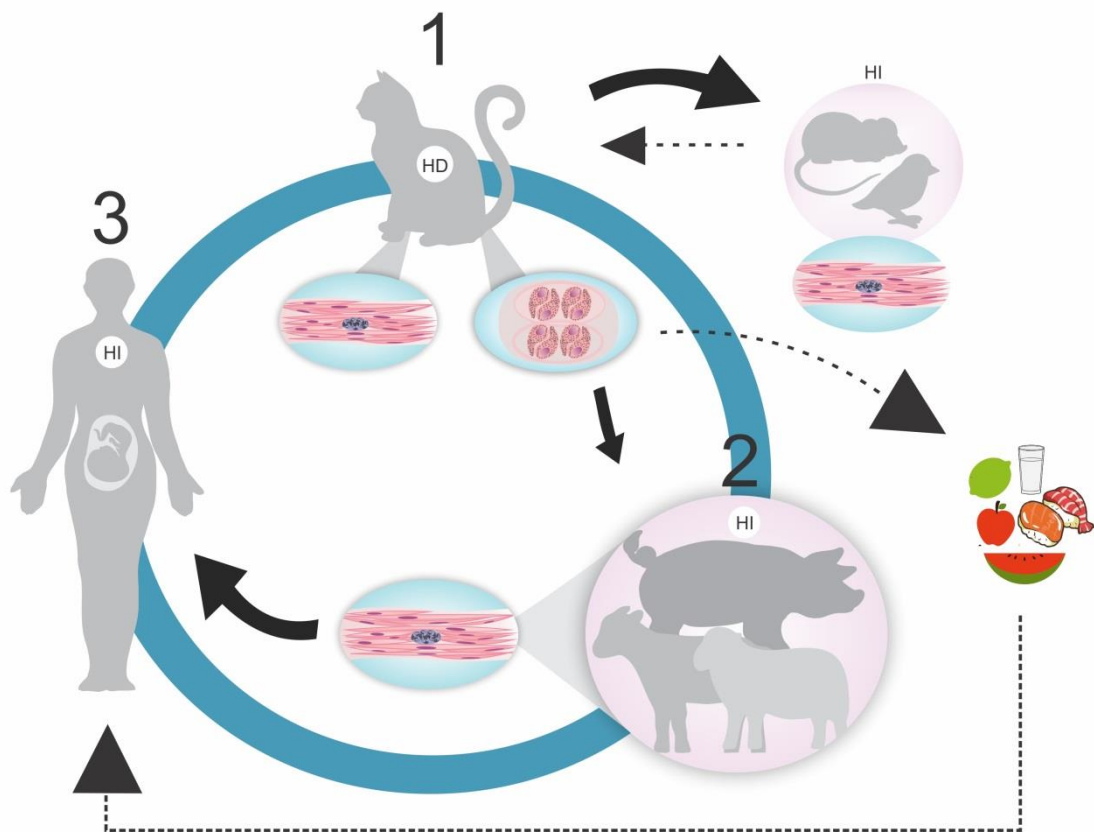


Figura 1. Ciclo de vida do protozoário *T. gondii*. Os felídeos, hospedeiros definitivos (HD) adquirem a infecção ao ingerirem oocistos liberados nas fezes por outros, ou cistos teciduais oriundos de hospedeiros intermediários (HI). Os oocistos liberados nas fezes, ao entrar em contato com umidade e oxigênio esporulam e se tornam infectantes (1). Por sua vez, animais de produção (2), podem contaminar-se ao ingerir oocistos ambientais ou cistos tissulares. No HI, o parasito realiza o ciclo assexuado, que culmina com a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos, fonte de infecção para o consumo humano, também susceptível de adquirir a infecção por meio da ingestão de alimentos contaminados. Outra forma de infecção ocorre através da passagem de taquizoítos através da via transplacentária (3).

Os taquizoítos são considerados a forma evolutiva de multiplicação rápida do *T. gondii*. Estes se distribuem por todo o organismo e podem provocar um quadro polissintomático, onde a gravidade irá depender da cepa do parasito, da suscetibilidade do hospedeiro e da quantidade de formas infectantes adquiridas. Em seguida, estes taquizoítos se encistam em diversos tecidos dando origem aos bradizoítos, que são as formas de multiplicação lenta e caracterizam a fase crônica da doença (DUBEY, 1994; AMATO; MARCHI, 2002; NEVES, 2003).

Os cistos teciduais apresentam parede elástica (<0,5 µm de espessura), com tamanho variando de 5 a 70 µm de diâmetro e podem conter centenas de bradizoítos, multiplicando-se lentamente por endodiogenia e persistindo por toda a vida do hospedeiro (DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). A formação de cistos é característica da fase crônica do ciclo do parasito e podem ser encontrados principalmente no sistema nervoso central e nos músculos esquelético e cardíaco, no entanto, estudos têm demonstrado a presença do parasito também em órgãos como baço, fígado, pulmão, rim, placenta e útero (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; TEDESCO et al., 2005; CALABRESE et al., 2008; BAYAT et al., 2013; FENOY et al., 2015; PENG et al., 2016; BABA et al., 2017; TEDFORD; MCCONKEY, 2017).

Diferentes cepas de *T. gondii* têm sido descritas pelo mundo, estas possuem variações quanto a sua virulência e são classificadas em três linhagens genéticas denominadas genótipos I, II e III (AJZENBERG et al., 2004; SOARES, 2004). Cepas do tipo I são as consideradas mais virulentas e têm sido encontradas em pacientes com doenças congênitas. Esse tipo de cepa é extremamente virulenta para camundongos e está associada à fase aguda da doença além de possuir a capacidade de se disseminar rapidamente pelo organismo. As cepas do tipo II e III são menos virulentas e tendem a estabelecer infecções crônicas com produção de cistos teciduais em camundongos, assim como, apresentarem maior taxa de crescimento *in vivo* (MONDRAGON et al., 1998; BLANDER; SAEIJ, 2009).

2.2 Resposta Imunológica durante a infecção por *T. gondii*

A resposta imunológica contra a infecção pelo *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Diferentes células participam deste processo de defesa, como células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos), células “natural killer” (NK), leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; WILSON et al., 2010).

O *T. gondii* é capaz de infectar qualquer tipo de célula nucleada e se disseminar através do organismo. Desse modo, a infecção gerada a partir da inoculação e disseminação do parasito pode desencadear manifestações patológicas, variando de uveíte congênita à inflamação intestinal, assim como pode se apresentar de forma assintomática, sendo esta a

forma mais comum, no entanto letal em pacientes imunocomprometidos (LIESENFELD, 2002; DOWSE et al., 2005; TEDESCO et al., 2007).

O processo de invasão do parasito no organismo acontece em cinco fases: (1) reconhecimento célula-célula; (2) adesão entre as células; (3) penetração no interior da célula hospedeira; (4) secreção de antígenos pelo protozoário e (5) modificações na membrana do vacúolo parasitóforo (MINEO; KASPER, 1994). A formação desse vacúolo parasitóforo ocorre durante a invasão do parasito, que dura cerca de 20 a 30 segundos, onde a membrana plasmática da célula hospedeira sofre uma invaginação desencadeando no vacúolo que envolve o parasito (DENKERS; BUTCHER, 2005). Este vacúolo possui a finalidade de proteger o parasito da sua eliminação pela célula hospedeira através do mecanismo endossomal de destruição do microorganismo (PENG et al., 2011).

O principal mecanismo de eliminação de parasitas intracelulares, particularmente *T. gondii*, é uma apresentação de resposta imune do tipo Th1 pelo hospedeiro que leva à produção de citocinas como: IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (GAZZINELLI et al., 1991; HUNTER et al., 1995; MACDONALD; MONTELEONE, 2001). A IL-12 e o IFN- γ estimulam a produção de óxido nítrico (NO), fundamental na eliminação do parasito (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997).

A principal forma de infecção pelo *T. gondii* é por via oral. Após chegar ao intestino, o parasito se depara com barreiras físicas e químicas que precisa ultrapassar para conseguir estabelecer a infecção. Durante a resposta celular frente à infecção pelo *T. gondii*, as células T CD8⁺, agem como células efetoras por possuírem ação citotóxica in vivo e pela produção de IFN- γ , agindo em conjunto com as células T CD4⁺ e induzindo a resistência à infecção. Esse padrão de resposta imunológica do tipo Th1 atua de forma crucial na restrição da disseminação do *T. gondii*. Estas células envolvidas são reguladas pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e agem promovendo a lise das células infectadas e expondo os parasitas, anteriormente protegido dentro do vacúolo parasitóforo e outras células efetoras como os macrófagos ativados e as células T citotóxicas (BROWN; MCLEOD, 1990).

A produção de IL-12 após a infecção por *T. gondii*, é mediada pela ativação de macrófagos e células dendríticas, tornando-se essencial para a indução da produção de IFN- γ pelas células NK. Deste modo, o TNF- α pode agir em sinergia com a IL-12 otimizando a

produção de IFN- γ por essas células (GAZZINELLI et al., 1993; BUZONI-GATEL et al., 2006).

O IFN- γ , inicialmente produzido pelas células NK, ativa as células dendríticas, os macrófagos e os enterócitos, promovendo a redução ou a eliminação do parasito (BUZONI-GATEL et al., 2006). Quando os macrófagos são ativados pelo IFN- γ produzem óxido nítrico, que conseqüentemente degradam o triptofano, essencial para o crescimento do parasito, o que permite a inibição da replicação ou a destruição do parasito por essas células (PFEFFERKORN et al., 1986). Com relação à imunidade inata, as células possuem receptores com capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como os receptores *Toll-like* (TLRs), importantes no desencadeamento inicial da resposta imune contra o *T. gondii* (DENKERS, 2010). A sinalização intracelular dos TLRs pode envolver o recrutamento da molécula MyD88, com o intuito de transmitir os sinais para as células do hospedeiro, induzindo o parasito a produzir IL-12 através de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas (DENKERS, 2003; 2010).

Em pesquisas utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, observou-se a importância do TNF- α na prevenção das encefalites conseqüentes da toxoplasmose, onde a diminuição de TNF- α pode desencadear um aumento da mortalidade de camundongos durante a fase aguda da enfermidade, independente da cepa utilizada (GAZZINELLI et al., 1993). Em outro estudo utilizando camundongos fêmeas grávidas observou-se uma correlação entre o aumento da susceptibilidade à infecção primária ao *T. gondii* e a diminuição da produção de IFN- γ (SHIRAHATA et al., 1992).

2.3 Placenta

Na maioria das espécies de mamíferos, uma gestação bem-sucedida requer interação materno-fetal, que ocorre através da placenta (SANTOS et al., 2015). Em primatas e roedores, esta interação está associada à implantação do feto no endométrio, permitindo a interação direta entre as células trofoblásticas e o sangue materno, sendo denominada de placenta hemocorial (MOSSMAN, 1937).

Histologicamente, a placenta humana e de roedores possuem grande semelhança (DARCY; ZENNER, 1993). Desse modo, o camundongo é o modelo

experimental mais frequentemente utilizado em estudos que descrevem a cinética de infecção nesse órgão por diversos agentes, assim como o *T. gondii* (FERRO et al., 1999). O estudo na placenta murina serve como modelo para o estudo da placenta humana (DAOLIO, 2018).

A placenta é considerada um órgão altamente especializado que possui como função proteger o feto contra patógenos e permitir o transporte de oxigênio, água, vitaminas, minerais e outros nutrientes necessários para o desenvolvimento fetal. Esta é constituída por uma porção materna, chamada de decídua, e mais dois compartimentos distintos na sua porção fetal: a zona juncional e a região do labirinto. A região decídua é formada pelas células deciduais, células “natural killer” uterinas, além de outras células importantes na defesa imunológica do embrião. A zona juncional, localizada próxima à decídua materna, é formada por células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas, que possuem função endócrina (GIBORI, 1994; SOARES et al., 1996) e células glicogênicas. Assim como a decídua, a região juncional é irrigada somente pelo sangue materno.

A região do labirinto é composta por vilosidades, considerada a principal região de troca de metabólitos na placenta (FERRO, 1991; ROSSANT; CROSS, 2001), possui irrigação tanto pelo sangue materno quanto pelo sangue fetal. Nesses animais, a barreira transplacentária é formada por camadas de células trofoblásticas juntamente com o endotélio fetal (LIMONGI; FERRO, 2003).

A implantação do blastocisto no endométrio uterino é o primeiro contato do tecido de origem embriológica com o tecido materno (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004). Em roedores, a implantação embrionária se inicia com o contato entre a membrana plasmática do blastocisto e do epitélio luminal, assegurando assim a sobrevivência do embrião através de uma superfície estável para trocas metabólicas e de nutrientes, que gradativamente torna-se mais complexa até a completa maturação da placenta (LIPPE, 2007; WATSON; CROSS, 2005). Esse processo de implantação acontece por volta do 5º dia de gestação; nessa fase o embrião se apresenta como uma esfera polarizada, possuindo uma cavidade central chamada de blastocele. Em um dos polos acontece uma aglomeração de células formando o embrioblasto, que originará o embrião. Em seguida a blastocele se torna revestida por uma camada de células achatadas, os trofoblastos, que dará origem à placenta e parte dos anexos placentários (BILLINGTON, 1971; MUNTENER et al., 1977).

O trofoblasto é um tipo celular conhecido por sua capacidade intensa de proliferação e diferenciação, possui características únicas, responsáveis por regular o processo de penetração na parede uterina, além de auxiliar na adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, assim como na nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (FERRO, 2000; NORWITZ et al., 2001). Durante a fase inicial da gestação, o trofoblasto pode ser dividido em duas porções: o trofoblasto mural, que reveste a blastocele, e o trofoblasto polar, que reveste a massa celular interna que dará origem ao embrião (BILLINGTON, 1971; MUNTENER et al., 1977).

Durante a gestação de camundongos, a interação entre o tecido materno e fetal ocorre através das células trofoblásticas, mantendo assim o embrião isolado dos tecidos maternos. A partir de então, autores sugerem que as células trofoblásticas, por possuírem capacidade invasiva e fagocitária, além de certa semelhança aos macrófagos, possam estar diretamente envolvidas em processos inflamatórios, na reabsorção embrionária e remodelação do tecido uterino (GALDINO, 2012). Ademais, autores não descartam a sugestão para inclusão das células trofoblásticas no sistema imune inato do organismo (GULERIA; POLLARD, 2000; SASMONO et al., 2003; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2010).

Após o processo de implantação e toda ação das células trofoblásticas, ocorre a decidualização da placenta. Esse processo é induzido pela ação da progesterona e do estrógeno, e está envolvido na diferenciação dos fibroblastos do estroma uterino em células deciduais, como resposta à implantação do blastocisto no útero (GLASSER, 1991). Dentre o 5º e o 8º dia de gestação, as células deciduais possuem a capacidade de envolver o sítio de implantação, tornando-se maiores, binucleadas ou poliploides (ANSELL et al., 1974).

Aproximadamente no 10º dia de gestação, com o funcionamento da placenta, a decídua sofre uma regressão até formar uma fina camada de células ao redor da placenta e do embrião, conhecidas como decídua basal e decídua capsular, respectivamente (LIM; WANG, 2010). Estas funcionam ainda como uma barreira seletiva de proteção ao embrião, corroborando para o sucesso da gestação (PARR et al., 1986).

2.4 Toxoplasmose Congênita e Resposta Imunológica

A toxoplasmose congênita ocorre durante o período gestacional. As vias de infecção para o feto são: via transplacentária, no qual ocorre a passagem de formas taquizoítas de *T. gondii* através da corrente sanguínea, alcançando a circulação e os tecidos fetais (CARLIER et al., 2012; KODJIKIAN, 2010); rompimento de cistos no endométrio durante a fase crônica da doença, onde cistos podem se romper por distensão mecânica ou ação lítica das vilosidades coriônicas da placenta, liberando os bradizoítos que podem infectar os fetos (NEVES, 2001). A severidade da patologia irá depender do período de gestação no qual houve a infecção (DUBEY, 2004).

A infecção dos tecidos placentários pode resultar em placentite e levar a uma infecção subsequente das células trofoblásticas. Nos mamíferos, a placenta serve como única fonte de troca de nutrientes e resíduos entre o compartimento materno-fetal e atua como uma barreira protetora, restringindo a passagem de patógenos ao feto (ANDER et al, 2018). Os danos à placenta podem causar perda do feto ou retardamento do crescimento intrauterino (ABBASI et al. 2003). No feto, a multiplicação do parasito induz focos de necrose e forte inflamação, levando a grandes alterações nos tecidos, principalmente no cérebro e olhos (DUBEY, 2010).

O grau de acometimento e o efeito da infecção congênita dependem de vários fatores: a interação entre o parasito e o hospedeiro; a virulência da cepa; o número de organismos envolvidos (parasitemia); a via de infecção; a capacidade de resposta imune (humoral e celular) do hospedeiro, bem como idade e características genéticas; a integridade das mucosas e das barreiras epiteliais; a idade gestacional na qual a infecção ocorreu; e o estágio de maturação do sistema imune do feto acometido (RORMAN et al., 2006).

Durante a gestação, ocorre um balanço no perfil imunológico Th1/Th2 que exerce influência crucial no desenvolvimento fetal, desencadeando a manutenção de uma gestação normal, cujo perfil favorável de resposta imune consiste no perfil Th2 com a secreção de citocinas anti-inflamatórias reguladoras. As células trofoblásticas humanas produzem então IL-10 e TGF- β (ENTRICAN, 2002) que promovem respostas imunes de perfil Th2 para assegurar a tolerância materno-fetal, no entanto, tal produção desencadeia o aumento significativo da invasão e replicação intracelular do *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008).

Em contrapartida, a produção de IFN- γ pelas células Natural Killer (NK) ou pelos linfócitos citotóxicos CD8+ irá controlar diretamente a invasão dos monócitos e de células trofoblásticas pelo *T. gondii*, assim como a replicação do parasito nas células infectadas. A secreção de IFN- γ provoca alta expressão das moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 na superfície dos trofoblastos, aumentando assim a adesão dos monócitos infectados na superfície das células trofoblásticas e desencadeando a perda da habilidade para apoptose. Conseqüentemente isso resulta na persistência do parasito nos tecidos placentários, tornando-se então reservatório para possível infecção congênita imediata ou tardia (PFAFF; CANDOLFI, 2008).

É importante ressaltar que esses mecanismos imunomoduladores são necessários para compensar a produção de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 que são induzidas pela ação do *T. gondii* e podem evitar a perda fetal, especialmente quando a infecção ocorre no início da gestação (ABOU BACAR et al., 2004; ZHANG et al., 2012).

2.5 Receptores tipo *Toll*

A invasão de patógenos no organismo desencadeia a ativação do sistema imunológico inato, levando à identificação destes pelos receptores do tipo *Toll*, os quais realizam o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (WEST et al., 2006; KAWAI et al., 2010), como parte da defesa imune inata contra patógenos, incluindo bactérias, vírus de DNA e RNA, fungos e protozoários.

A ativação da maioria das vias de TLRs e seus respectivos ligantes resulta na rápida translocação nuclear do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e conseqüente síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias. O reconhecimento de ligantes microbianos pela família de receptores TLR ativa uma cascata de sinalização complexa através de moléculas bem definidas, resultando na expressão de uma série de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , IL-6 e IL-8 (KAWAI; AKIRA, 2007).

Os TLRs representam a família de receptores nas células da interface materno-fetal. São glicoproteínas integrais de membrana que possuem domínios extracelulares ricos em leucina, considerados a família mais importante de receptores de reconhecimento de padrões, devido à sua capacidade de regular a resposta imune inata e adaptativa (RADSTAKE et al., 2004; SHIBOLET; PODOLSKY, 2007). Quatorze TLRs de mamíferos foram

identificados, sendo os TLRs 1-10 expressos em seres humanos (AKIRA et al., 2010; NAKAMOTO; KANAI, 2014). Dos 14 TLRs descritos, 10 já foram identificados em células do ambiente placentário e sua expressão pelo trofoblasto varia segundo o estágio gestacional. Cada TLR difere em suas especificidades, mas todos eles, após interagirem com seus ligantes, recrutam proteínas adaptadas à sinalização celular e ativam a secreção de citocinas, conduzindo a uma resposta inflamatória (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

A estimulação desses receptores por antígenos estranhos induz a produção de citocinas imunoativadoras e imunorreguladoras (NAKAMOTO; KANAI, 2014). Evidências apontam que o TLR 2, TLR 4 e TLR 9 podem atuar de forma efetiva no reconhecimento do *T. gondii* em humanos (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007).

Sabe-se que os receptores tipo *Toll* desempenham um papel crítico na resposta imune inata em mamíferos, ativando as cascatas de transdução de sinal que levam à expressão de genes após o reconhecimento de seus respectivos ligantes. Entretanto, o papel dos TLRs durante a infecção por *T. gondii* pode estar relacionado ao perfil genético dos camundongos, às inoculações infecciosas e à cepa do parasito utilizada (MUN et al., 2003). Estudos realizados anteriormente relatam que macrófagos deficientes em TLR 2 não possuem a capacidade de produzir IL-12 e óxido nítrico, produzidos em resposta à infecção (KASPER et al., 2004).

Durante a gestação, os TLRs, e mais particularmente aqueles que são expressos nas células imunes da placenta e no trofoblasto, podem levar ao desenvolvimento de distúrbios materno-fetais e induzir respostas imunes subsequentes (KAWAI; AKIRA, 2009; PINEDA et al., 2011). Assim, os trofoblastos possuem a capacidade de responder aos patógenos virais via TLR 3, produzindo interferons e secretando citocinas e quimiocinas (KOGA; MOR, 2008). Em relação às infecções bacterianas, o TLR 2 e o TLR 4 induzem a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelas células trofoblásticas. Portanto, qualquer alteração ou defeito na expressão e função dos TLRs pode levar a uma placentação anormal e complicações na gravidez (KOGA; MOR, 2008).

Estudos com células trofoblásticas do primeiro trimestre gestacional indicaram que a ativação de TLR 4 por LPS levou à produção de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na interface materno-fetal. Em seguida, relatou-se a presença de TLR 2 solúvel no líquido amniótico, capaz de se ligar a patógenos e em seguida destruí-los por fagocitose ou

pelo sistema de complemento que subsequentemente leva à regulação de respostas dependentes de TLR (DULAY et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar histopatologicamente e avaliar a expressão dos receptores tipo *Toll* 2 e 4 na placenta e de camundongos experimentalmente infectadas com *Toxoplasma gondii* em diferentes terços gestacionais.

3.2 Específicos

- Realizar cruzamento de camundongos C57BL/6 e infecção por *T. gondii* em fêmeas durante diferentes terços gestacionais;
- Avaliar alterações histopatológicas no cérebro das fêmeas, na placenta e na cabeça dos fetos associados à infecção por *T. gondii* em diferentes terços gestacionais;
- Detectar o DNA de *T. gondii* no cérebro das fêmeas infectadas em diferentes terços gestacionais.
- Comparar a expressão de TLR 2 e 4 na placenta de fêmeas infectadas por *T. gondii* em diferentes terços gestacionais;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este experimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais/IOC-FIOCRUZ com Licença nº 020/2017.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, 4 semanas de idade, provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ. Durante todo o período foi fornecido água e comida *ad libitum* aos animais.

4.3 Obtenção dos cistos de *Toxoplasma gondii*

Cistos teciduais de *T. gondii* da cepa ME-49 foram obtidos a partir de cérebros de camundongos C57BL/6 previamente infectados e mantidos em passagens seriadas (Figura 2). Os camundongos foram eutanasiados 45 dias após a infecção através de aprofundamento anestésico com ketamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) e xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009). Os cérebros foram removidos, macerados e homogeneizados em solução tampão fosfato-salina (PBS) estéril. A suspensão obtida foi submetida à centrifugação para a purificação de acordo Freyre (1995) e Popiel et al. (1996). O sedimento foi ressuspenso em 2mL de PBS estéril e 20µL da suspensão foi utilizada para determinação da concentração de cistos através da contagem em microscópio óptico (objetiva de 40x).

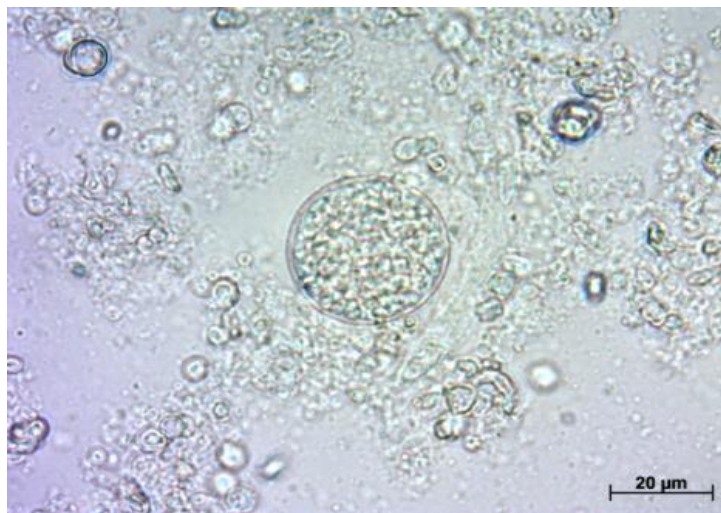


Figura 2. Cisto tecidual de *T. gondii* obtido a partir de cérebro de camundongos C57BL/6. Aumento 40x.

4.4 Delineamento experimental: acasalamento, detecção de prenhez, número amostral e infecção

Foram utilizados, no experimento, 80 fêmeas e 8 machos de camundongos da linhagem C57BL/6. As fêmeas foram acasaladas com machos na razão de 2:1 durante 48 horas. Para detecção da prenhez foi observado a presença ou ausência do tampão vaginal (plug) e pesagem diária das fêmeas para avaliação do ganho de peso. Posteriormente, as fêmeas prenhes foram agrupadas com base no período gestacional da infecção (primeiro, segundo e terceiro terço) tomando como base o período gestacional médio de 21 dias para esta espécie. Fêmeas prenhes com a mesma idade gestacional correspondente e não infectadas foram incluídas como controle.

Foram realizados 19 ciclos de acasalamento, resultando no total de 26 animais prenhes. Ao final do experimento, foram selecionados aleatoriamente 20 animais prenhes que constituíram o N amostral da pesquisa. O delineamento experimental foi estabelecido a partir da distribuição desse N amostral em 4 grupos conforme descrição abaixo:

- G1: animais controle, fêmeas prenhes não infectadas (n=5);
- G2: fêmeas prenhes infectadas no primeiro terço gestacional (n=5);
- G3: fêmeas prenhes infectadas no segundo terço gestacional (n=5);

- G4: fêmeas prenhes infectadas no terceiro terço gestacional (n=5).

Os animais foram infectados por via intragástrica (gavagem) com 20 cistos diluídos em 0,1 mL de PBS estéril de modo que a data entre a infecção e a eutanásia estivesse dentro do período gestacional de cada grupo estudado, conforme a seguir: primeiro terço, fêmeas infectadas entre o 3º e 4º dia de gestação; segundo terço, fêmeas infectadas entre o 8º e 9º dia de gestação; e terceiro terço, fêmeas infectadas no entre o 14º e 15º dia de gestação (Figura 3). Os animais do grupo controle, fêmeas prenhas e não infectadas, receberam 0,1 mL de PBS estéril sem os cistos. No 18º dia de gestação as fêmeas foram eutanasiadas através de aprofundamento anestésico com ketamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) e xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009). Após a eutanásia, foram coletados fragmentos do cérebro das fêmeas prenhas, assim como da cabeça dos fetos e placenta, seccionados e devidamente acondicionados para posteriores análises.

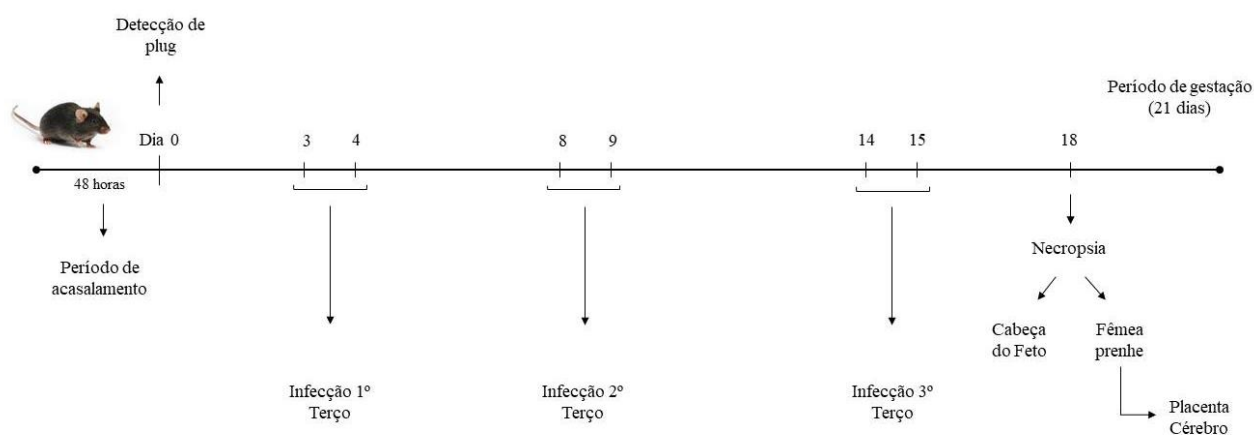


Figura 3. Delineamento experimental de acasalamento de camundongos C57BL/6 e infecção por *T. gondii*.

4.5 Histopatologia

Os fragmentos de tecidos obtidos foram fixados em paraformaldeído a 4% e processados para a preparação de lâminas histológicas, sendo colocados em cassetes plásticos, seguido da etapa de desidratação, no qual o material foi mergulhado em concentrações crescentes de álcool (álcool 70%, 80%, 95%, absoluto I e II, correspondentes a 99% de

pureza). Em seguida, realizou-se o processo de diafanização ou clarificação através de banhos em xilol e, posteriormente, realizou-se inclusão do tecido em parafina.

O material foi cortado na espessura de cinco micrômetros (5 μ m) com micrótomo de rotação HM 360 MICROM e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). Antes da coloração, as lâminas foram banhadas em xilol, por 10 minutos para dissolução da parafina, em seguida, imersas em concentrações crescentes de álcool, até o tecido estar completamente hidratado. Então as lâminas foram mergulhadas em água destilada por três minutos, em seguida, mergulhadas em hematoxilina, por aproximadamente um minuto, lavadas por 15 minutos em água destilada, mergulhadas em eosina por 45 segundos e para a lavagem foram mergulhadas e retiradas rapidamente em água corrente. Depois de corado, o tecido foi desidratado em concentrações decrescentes de álcool, para aumentar a sobrevivência do preparo histológico. Finalmente as lâminas foram banhadas em xilol, e em seguida, iniciada a montagem das lâminas, processo no qual foi colocado sobre uma lamínula uma gota de resina sintética e esta colocada e comprimida sobre o corte, de modo a espalhar-se uma fina camada desta entre a lâmina e lamínula.

Foi atribuído escore para as lesões observadas no encéfalo, na placenta e na cabeça do feto dos animais dos diferentes grupos experimentais, atribuindo-se valores de acordo com a intensidade das lesões: 0 para ausência de lesões, 1 para discreta, 2 para moderada e 3 para intensa.

4.6 Extração de DNA

Para a extração de DNA de *T. gondii* das amostras do cérebro das fêmeas prenhes, o tecido foi submetido a digestão em 500 μ L de tampão de lise (Tris 500 mM pH 9,0, EDTA 20 mM, NaCl 10 mM, SDS a 1%) com proteinase K (20 mg/mL; Sigma-Aldrich) overnight a 56°C, e posterior extração por fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi utilizado para a detecção de DNA de *T. gondii* pela PCR convencional, utilizando-se os primers TOX4 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') e TOX5

(5'CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT3'), segundo descrito por Homan et al. (2000), que amplifica uma região de 529 pares de base (pb). Cada reação teve um volume total de 25µL, sendo: 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, buffer); 1,5µL de cada primer (2,5pmol); 4,5µL de água DNase e RNase free; e 5µL de amostra de DNA extraída (100µg/µL). Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, utilizando marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder Promega®), programação na cuba de eletroforese de 100V, 70 mA, 50W e 50 minutos de corrida. Após esta etapa, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema de fotodocumentação digital, sob luz ultravioleta e em computador específico.

4.8 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Para a extração de RNA, as amostras foram armazenadas em criotubos estéreis livre de RNase, congeladas -70 °C até a extração de RNA. Primeiramente o tecido coletado foi macerado mecanicamente e adicionado 500µL de Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), em microtubo livre de RNase. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente e incubado em temperatura ambiente por três minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases. A fase superior foi transferida para outro microtubo e adicionou-se 500µL de isopropanol, para precipitação do RNA, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o RNA foi dissolvido em 30µL de água livre de RNase e as amostras foram quantificadas por espectrofotometria. Todo o protocolo descrito foi preconizado pela Invitrogen; Carlsbad, CA, USA.

Posteriormente, o RNA (1,0 µg) foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD), seguindo o protocolo do fabricante. Para uma reação de volume final de 20µL. Para a síntese foram utilizados 5,0µL de RNA, 11,0µL de água livre de nuclease, e 4,0µL do iScript RT Supermix. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 25°C por 5 minutos (*priming*), 46°C por 20 minutos (*reverse transcription*) e 95°C por 1 minuto (*RT inactivation*).

4.9 Quantificação da expressão gênica de TLR2 e 4 por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O cDNA diluído (1:4) foi utilizado como molde da qPCR, empregando-se os iniciadores específicos para cada gene descritos na tabela 1. A reação foi realizada utilizando-se 5,0µl de cDNA, 1,0µL do par de primers específico para cada gene (2,5pmol), 12,5µL de GoTaq qPCR Master Mix (PROMEGA) e 5,5µL de água, em um volume final de 25 µL por reação. Os parâmetros utilizados para o PCR em tempo real foram: 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando o termociclador QuantStudio™ 3 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores utilizados no qRT-PCR.

| Gene | Iniciadores (5'-3') | GeneBank | Referência |
|-------|---|-------------|-----------------------------------|
| TLR2 | CTTCCTGGTTCCTGCTCGTTCTC CAAGAACAAAGAAAATGAGTCAAG | NM011905.2 | ORSATTI et al., 2010 |
| TLR4 | TGACAGGAAACCCTATCCAGAGTT TCTCCACAGCCACCAGATTCT | NM021297.2 | ORSATTI et al., 2010 |
| RPLP0 | GCCAGCTCAGAACACTGGTCTA ATGCCCAAAGCCTGGAAGA | NM_007475.5 | ALMEIDA- SOUZA et al., 2016 |

4.10 Análise Estatística

Para avaliação do ganho de peso corporal, as médias \pm desvio padrão dos valores de peso corporal foram utilizadas para a análise de variância e posterior teste de comparação múltipla de Tukey entre os grupos e os tempos. Na análise histopatológica, as médias de escores foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Os dados de qPCR foram analisados utilizando o método Ct comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os

valores de Ct foram normalizados com base na expressão de RPLP0. Em seguida realizou-se a análise pelo teste Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software (Graphpad Prism Software 7.00, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 19 ciclos de acasalamento realizados, obtivemos 46,25% das fêmeas (37/80) com gestação confirmada. Durante o experimento não houve perda de animais pela infecção aguda por *T. gondii*, no entanto, foi possível observar fêmeas parindo antes dos 21 dias de gestação, período médio gestacional descrito na literatura para esta espécie. Dentre as fêmeas gestantes, 29,73% (11/37) manifestaram partos prematuros, as quais foram utilizadas em um experimento adicional (dados não mostrados), com a seguinte configuração de infecção experimental: 3 fêmeas infectadas no 1º terço gestacional; 5 fêmeas infectadas no 2º terço e 3 fêmeas infectadas no 3º terço de gestação. Os dados obtidos desta experimentação adicional não fazem parte dos objetivos desta pesquisa, no entanto, serão trabalhados posteriormente, dando continuidade a linha de pesquisa.

Das 26 (70,27%) fêmeas que vieram a termo foi possível realizar a distribuição nos seguintes grupos: 8 fêmeas prenhes não infectadas (grupo controle); 8 fêmeas prenhes infectadas no primeiro terço de gestação; 5 fêmeas prenhes infectadas no segundo terço de gestação; e 5 fêmeas prenhes infectadas no terceiro terço de gestação (Figura 4). Contudo, visando a uniformidade do N amostral nos grupos experimentais, preconizamos para as avaliações laboratoriais, a utilização de 5 animais por grupo, totalizando 20 animais, conforme descrito no ítem material e métodos.

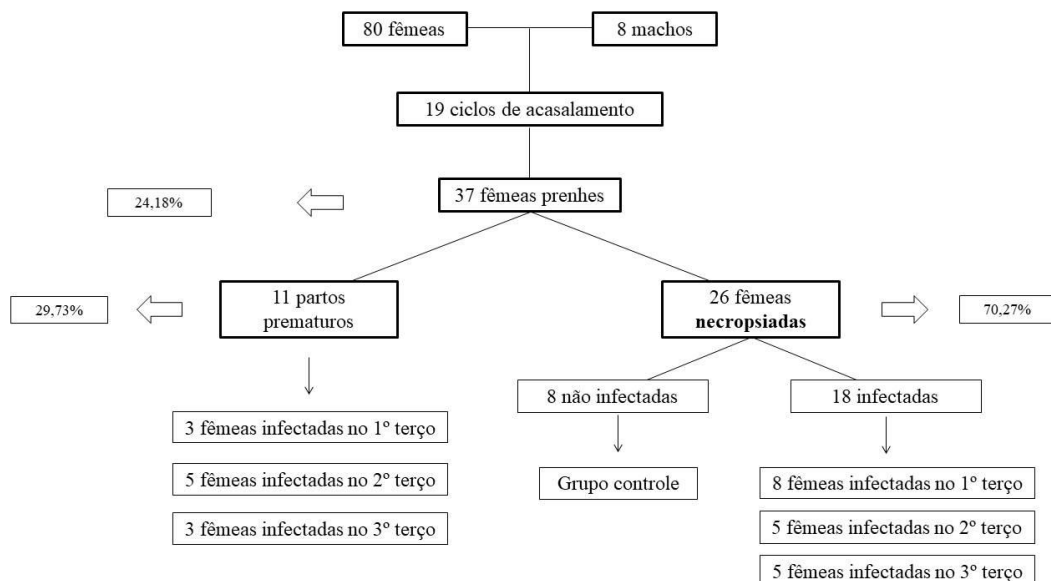


Figura 4. Fluxograma de acasalamento e inoculação de *T. gondii* em camundongos C57BL/6.

Na literatura, dados são escassos sobre partos prematuros durante a infecção experimental por *T. gondii*, no entanto, pesquisas utilizando delineamento experimental semelhante ao descrito neste trabalho, verificou taxas de aborto de 90% em animais C57BL/6 infectados experimentalmente por *T. gondii*, sugerindo que o parasito prejudicou o desenvolvimento da gestação normal e que a infecção no início da gravidez induz perda fetal (COUTINHO et al., 2012).

Durante nosso experimento, avaliamos o ganho de peso dos animais para confirmação da gestação. Quando comparado o peso corporal das fêmeas inoculadas com *T. gondii*, foi possível observar claramente uma diferença estatística significativa entre as fêmeas prenhes e não prenhes. A partir do 10º dia de gestação, houve um aumento no peso das fêmeas prenhes, devido ao crescimento fetal, enquanto as fêmeas não prenhes, em sua maioria, perderam peso no decorrer dos dias, provavelmente devido a infecção. (Figura 5)

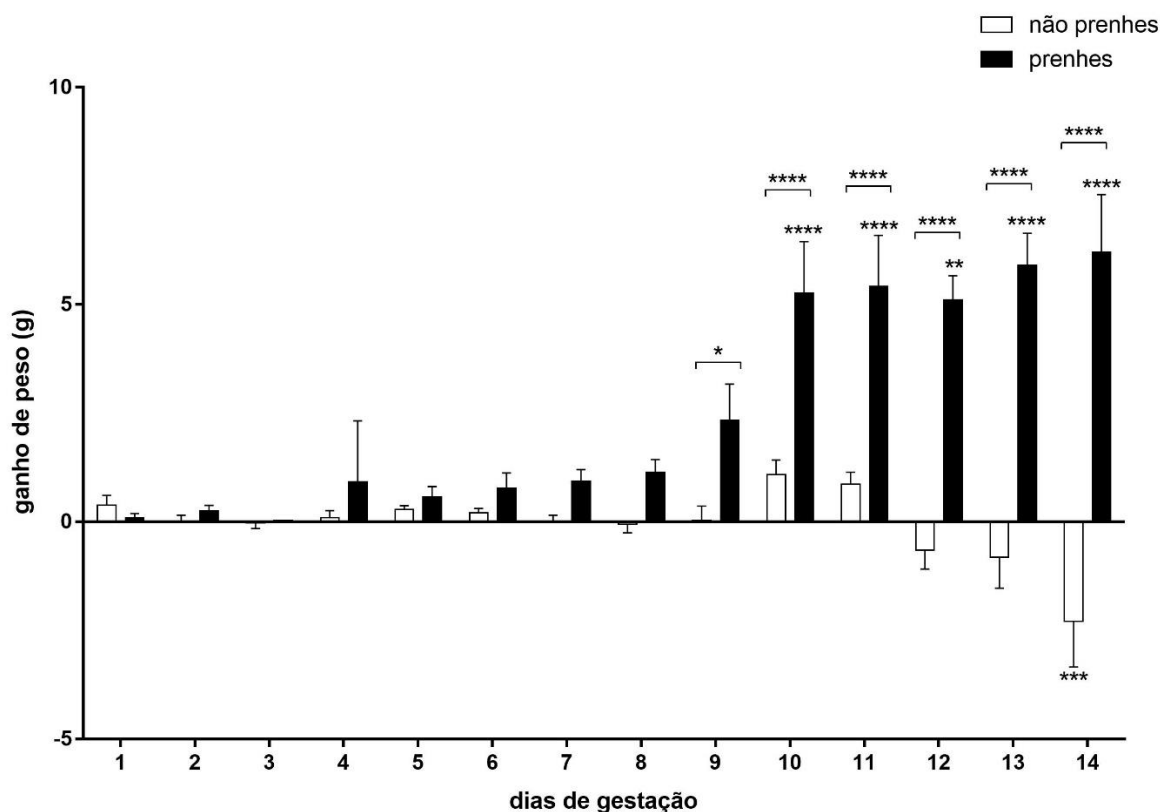


Figura 5. Avaliação do peso corporal das fêmeas C57BL/6 após os ciclos de acasalamento. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado ao menos em triplicata, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ quando comparado com o dia 1, ou entre os colchetes, após análise de variância e teste de comparação múltipla de Tukey.

A literatura descreve a detecção do tampão vaginal como o método mais utilizado para confirmação da cópula e desencadeamento da prenhez em camundongos, no entanto, nosso estudo demonstrou que essa metodologia aliada à pesagem diária dos animais para observação do ganho de peso é uma ferramenta a mais que pode ser utilizada para a confirmação da gestação, conforme descrito em estudo com infecção experimental de *Calomys callosus* por cepas brasileiras de *T. gondii*, onde foi observada perda significativa de peso em fêmeas infectadas com a cepa TgChBrUD2 a partir do 7º dia após a infecção (FRANCO et al., 2014).

Dentre as análises laboratoriais desenvolvidas na pesquisa, realizou-se a avaliação histopatológica do encéfalo, da placenta e da cabeça dos fetos dos animais dos diferentes grupos experimentais. A análise do grupo controle não infectado não demonstrou alterações ou anormalidades estruturais em nenhum dos tecidos avaliados, assim como na avaliação da cabeça dos fetos, conforme esperado. Na placenta dos animais pertencentes aos grupos inoculados por *T. gondii* em três momentos diferentes (1º, 2º e 3º terços) da gestação, observou-se lesões inflamatórias caracterizadas por infiltrado inflamatório neutrofílico e linfocitário associado à necrose de coagulação na região labiríntica, principalmente nos animais inoculados no segundo terço de gestação (Figura 6).

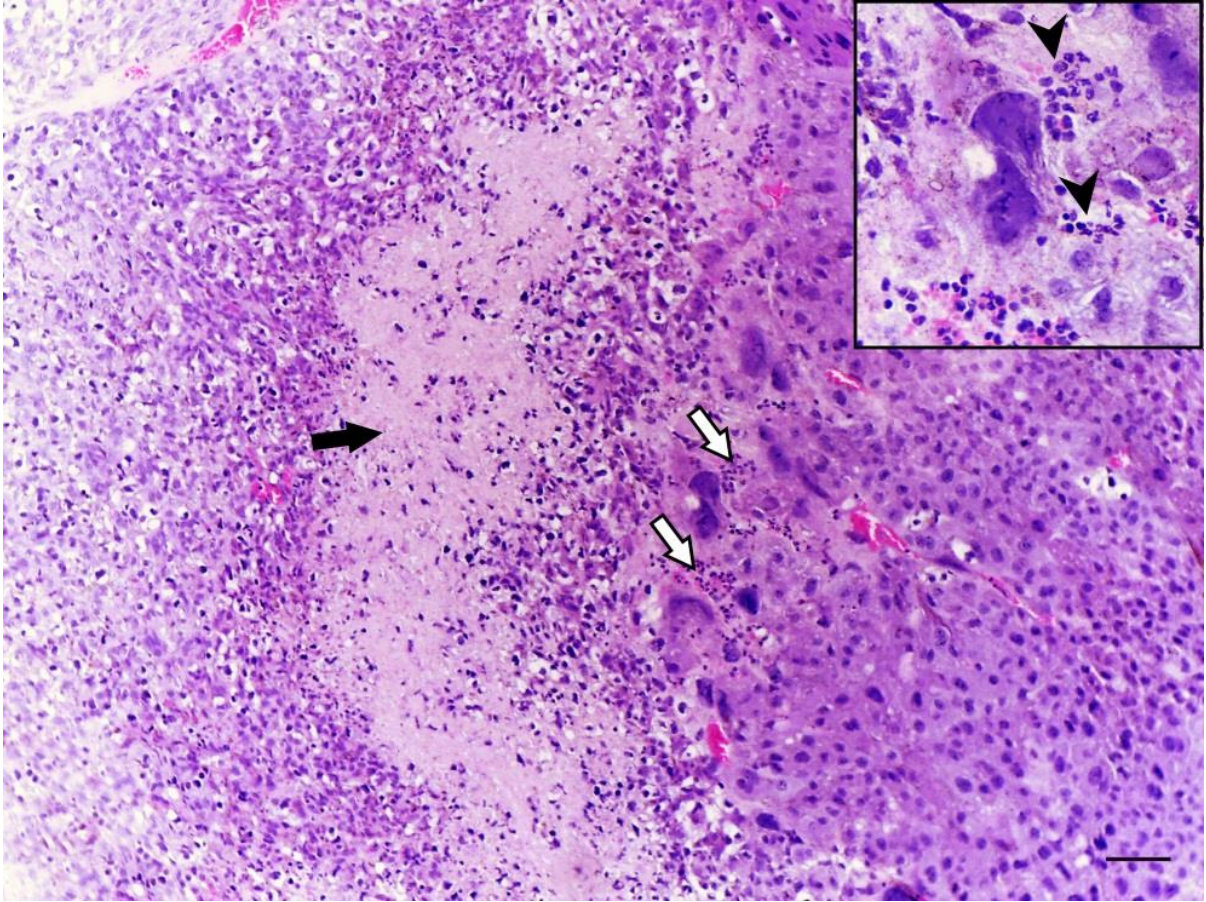


Figura 6. Imagem representativa de alterações inflamatórias na placenta de camundongos fêmeas C57BL/6 infectadas com *T. gondii* ME-49 no segundo terço da gestação. Área focalmente extensa de necrose de coagulação (seta preta) moderada associada a áreas multifocais de infiltrado inflamatório neutrofílico em moderada quantidade (setas brancas) na camada labiríntica da placenta. No detalhe é possível observar moderada quantidade de neutrófilos (cabeças de setas). Hematoxilina e Eosina (400X). Barra: 50 μ m.

A média de escore das lesões inflamatórias observadas na placenta dos animais inoculados no 2º terço de gestação foi significativamente maior ($P < 0.05$) quando comparada às lesões observadas nos animais inoculados no 1º e 3º terço de gestação (Figura 7).

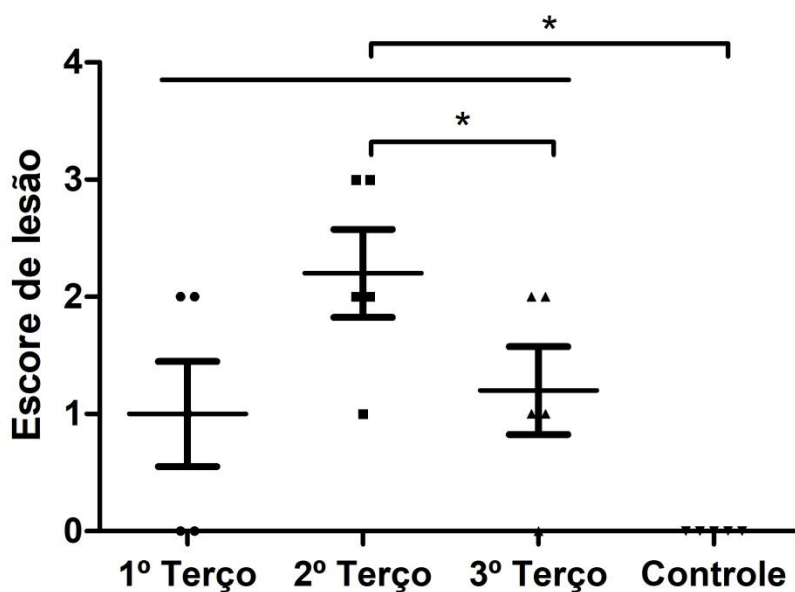


Figura 7. Escore de lesões inflamatórias na placenta de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* ME-49 ao longo da gestação. Médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. * $P < 0.05$.

Os resultados obtidos nessa pesquisa sugerem que a resposta pró-inflamatória observada na avaliação histopatológica, pode ter sido induzida pela proliferação e invasão de *T. gondii* na placenta. A quantidade de alterações encontradas pode estar relacionada com o tempo de infecção entre os diferentes grupos. Todos os animais foram necropsiados no mesmo dia de gestação (18º dia), no entanto, os animais infectados no primeiro terço possuíam 15 dias de infecção; os infectados no segundo terço, 10 dias e os infectados no terceiro terço gestacional possuíam apenas 4 dias de infecção. Deste modo, podemos sugerir que os animais infectados no primeiro terço, apresentaram alterações em menor quantidade provavelmente devido à resposta imunológica do animal, que pode com esse tempo, ter efetivado um controle à multiplicação e disseminação do parasito, e conseqüentemente presença de menor quantidade de lesões. Com relação as fêmeas inofectadas no terceiro terço, as quais possuem menos tempo de infecção, esse resultado pode estar relacionado com o início da infecção e começo da multiplicação e distribuição do parasito no organismo, desencadeando em poucas alterações observadas na análise histopatológica.

Em estudo experimental semelhante, contudo, utilizando a cepa PRU de *T. gondii*, a análise histopatológica da placenta demonstrou presença de necrose discreta e

infiltrado de células inflamatórias localizadas entre decídua e o labirinto coriônico, causando congestão e hemorragia em zonas adjacentes, além de trombos de tamanhos diferentes que variavam de acordo com a gravidade e a dose administrada do parasito (LIU et al., 2018). Em outro estudo realizado por Coutinho et al. (2012) na placenta de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados experimentalmente por *T. gondii*, também foi observado um resultado consistente com o que foi descrito nesta pesquisa, onde se evidenciou predominantemente infiltrado inflamatório multifocal na decídua, hemorragia e necrose, sobretudo em camundongos C57BL/6, 8 dias pós-infecção. Estes autores sugerem que a elevada resposta imune inflamatória induzida por *T. gondii* nos úteros e placentas de camundongos C57BL/6 desencadeou a necrose dos locais de implantação e conseqüentemente maior perda de embriões nessa linhagem de camundongos em comparação com os camundongos BALB/c.

Durante as análises não foi possível observar presença de formas infectantes de *T. gondii* na placenta dos animais. Resultados semelhantes foram descritos por Ferro et al. (2014) onde este descreve que a ausência do parasito na zona de junção da placenta é comumente observada e pode ser explicada pelo fato de que, nesta região, a invasão de *T. gondii* ocorre mais tarde devido a presença de certas células neste local que são isoladas do sangue materno por células gigantes trofoblásticas (FERRO et al., 2014).

Na análise histopatológica do encéfalo das fêmeas dos diferentes grupos experimentais, foi possível observar lesões inflamatórias caracterizadas por infiltrado inflamatório histio-linfocitário multifocal associado à necrose de coagulação no parênquima cerebral (Fig 8A), manguito perivascular histio-linfocitário multifocal (Fig. 8B), além de gliose multifocal moderada e satelitose multifocal (Fig. 8C) e lesões degenerativas caracterizadas por vacuolização do neurópilo multifocal (Fig. 8B).

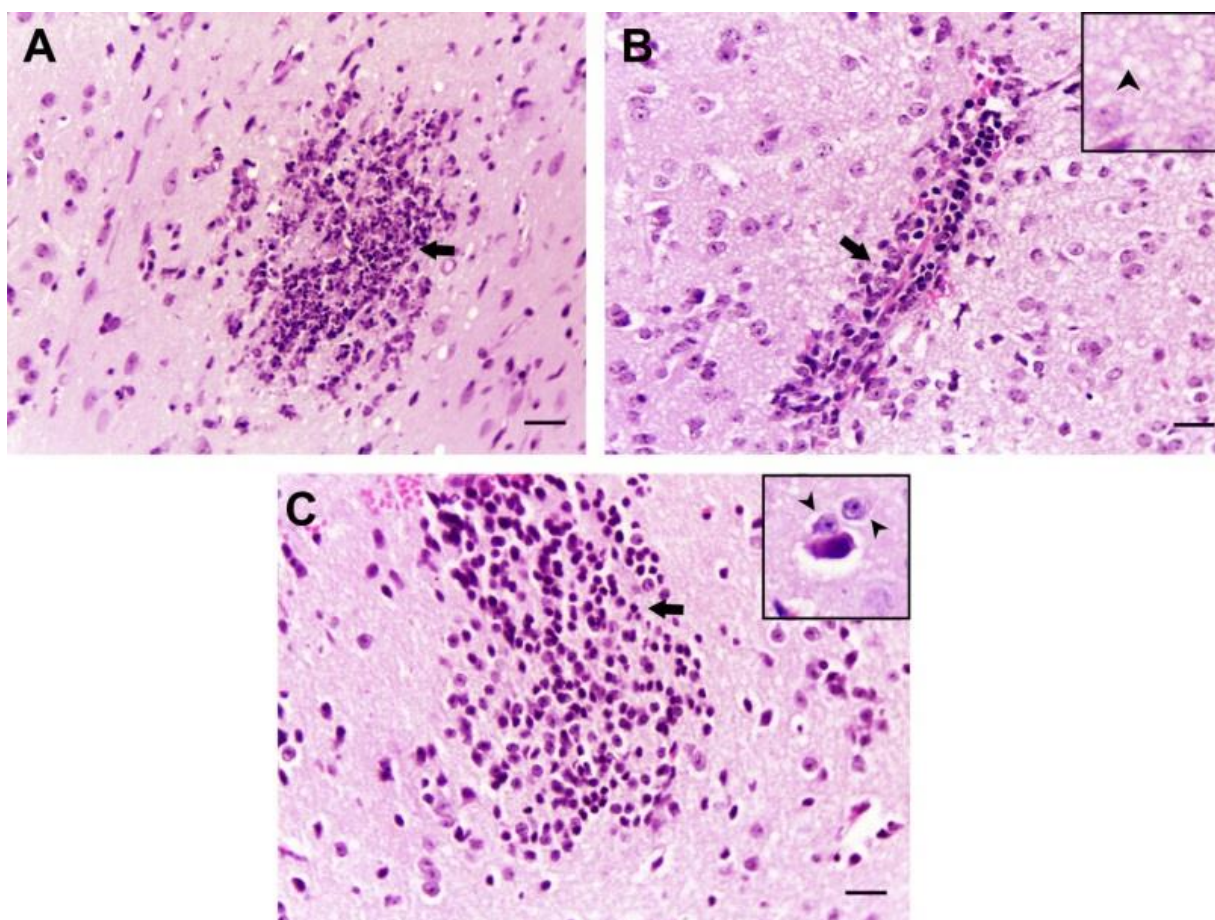


Figura 8. Imagens representativas das alterações microscópicas no encéfalo de camundongos fêmeas C57BL/6 infectadas com *T. gondii* ME-49 em diferentes momentos da gestação (todas as micrografias são do segundo terço). (A) Área focal de encefalite necrotizante não supurada moderada na substância cinzenta do córtex cerebral (seta). (B) Vênula no parênquima cerebral rodeada por 2 a 3 camadas de células inflamatórias mononucleares, caracterizando o manguito perivascular na substância cinzenta do córtex cerebral (seta). No detalhe é possível observar vacuolização moderada do neurópilo (cabeça de seta). (C) Área focalmente extensa de gliose moderada na substância cinzenta do córtex cerebral (seta). No detalhe é possível observar oligodendrócitos (cabeças de setas) ao redor de um neurônio, caracterizando uma área de satelitose moderada. Hematoxilina e Eosina (400X). Barra: 50 μ m.

As lesões descritas no cérebro dos camundongos apresentaram maior escore nos animais inoculados no segundo terço de gestação, quando comparado aos demais (Figura 9). A menor quantidade de lesões cerebrais durante a fase aguda da toxoplasmose após

infecção oral em camundongos também foi observada em outros estudos (DJURKOVIC´-DJAKOVIC´ et al., 2006; DUBEY et al., 2012; LIESENFELD et al., 1996; MORDUE et al., 2001; SMILEY et al., 2005) e acredita-se então que a barreira hematoencefálica retarda o influxo de células infectadas, mediadores de inflamação e anticorpos para o cérebro, importantes na fase crônica da infecção, diminuindo assim a quantidade de parasito na região. Além disso, o cérebro tem sido descrito como último órgão a ser atingido pelos taquizoítos de *T. gondii* durante a infecção (DUBEY et al., 2012; FRENKEL, 1988).

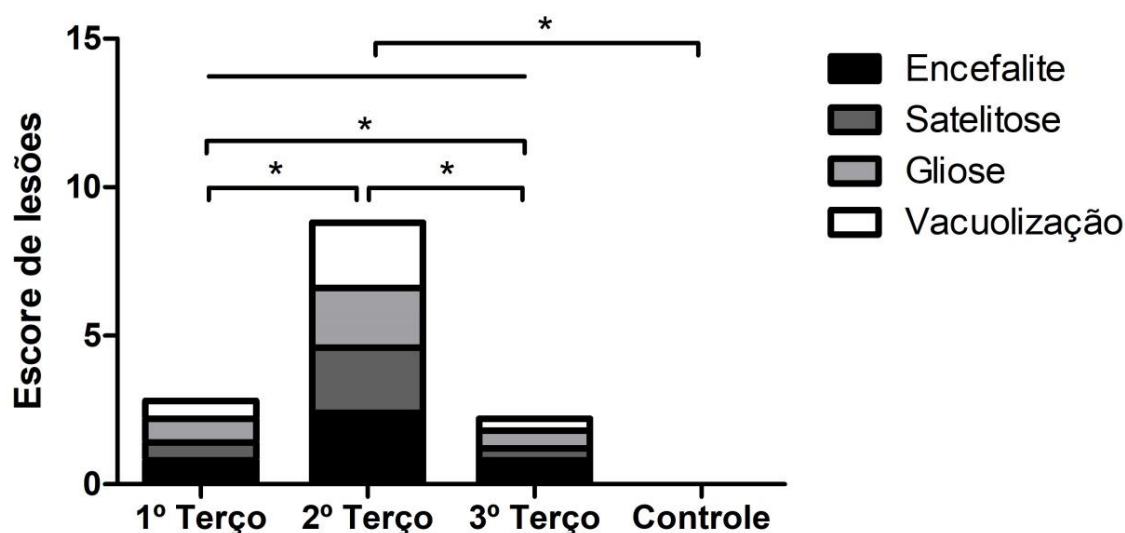


Figura 9. Escores de lesões no encéfalo de camundongos fêmeas C57BL/6 inoculadas com *T. gondii* ME-49 ao longo da gestação. Médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. * $P < 0.05$.

Resultados semelhantes aos achados dessa pesquisa foram descritos por Atmaca et al. (2014), os quais evidenciaram que a infecção induzida pelo *T. gondii* causa intensa reação inflamatória no cérebro a partir de 10 dpi, com a presença de infiltrado de células mononucleares nas regiões perivascular e meninge. Da mesma forma, resultados consistentes têm sido descritos em outras pesquisas, evidenciado a presença de alterações que confirmem a hipótese dos nossos resultados, onde o tempo de infecção está diretamente relacionado com as alterações observadas nos tecidos, como pode ser observado nos resultados descritos por Silva et al. (2010) e Pereira et al. (2017), onde estes descrevem

presença de intensa e progressiva alteração inflamatória no sistema nervoso central de a partir de 7 e 9 dpi.

Em pesquisa realizada por Costa et al. (2018), com o intuito de avaliar as alterações histopatológicas em camundongos infectados na fase aguda e crônica da toxoplasmose, não foi possível detectar alterações histopatológicas nos cérebros de camundongos infectados na fase aguda, aos nove dias pós-infecção, enquanto que os grupos cronicamente infectados apresentaram meningoencefalite leve. Adicionalmente, estudo comparativo entre as linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados por via oral com a cepa PRU de *T. gondii*, foi possível observar lesões histopatológicas significativamente mais severas (inflamação moderada a grave, infiltrado inflamatório difuso e necrose) nos cérebros de camundongos C57BL/6 em comparação àqueles de camundongos BALB/c em diferentes momentos pós-infecção (14, 35, 50 e 70 dias pós-infecção) (LIU et al., 2018).

Esses resultados estão de acordo com os descrito por Djurkovic-Djakovic et al. (2006) o qual descreve que a presença de lesões inflamatórias mais graves foram observadas no seu experimento somente 8 semanas pós infecção com cepas BGD1 e ME49 de *T. gondii*. Meningoencefalite grave foi observada e esta associada à presença de numerosos cistos cerebrais nos camundongos infectados com ambas as cepas. Este autor acrescenta a importância da presença de cistos associadas a lesões graves no cérebro, uma vez que as cepas do tipo II de *T. gondii*, geralmente induzem encefalite leve em camundongos (COSTA et al., 2018).

Nas análises histopatológicas não foi possível observar nenhuma estrutura morfológicamente sugestiva de taquizoítos e/ou cistos teciduais nos tecidos avaliados. A formação de cistos teciduais acontece principalmente na fase crônica da doença, onde ocorre ausência ou redução drástica dos taquizoítos circulantes, diferenciação destes em bradizoítos e formação dos cistos (BLADER e SAEIJ, 2009).

Pesquisas utilizando camundongos infectados com a cepa ME-49 (cepa tipo II) descrevem um elevado número de cistos cerebrais em 30 dias pós-infecção, período onde a infecção crônica já está estabelecida (SUZUKI et al., 1989; HIRAMOTO et al., 2002). A presença de cistos teciduais nessa fase da toxoplasmose geralmente está associada a presença de lesões inflamatórias nesse tecido. Meningite não purulenta não supurativa e/ou necrosante, degeneração neuronal, gliose focal, hiperemia, infiltrado de células mononucleares

perivasculares e células de Purkinje diminuídas de tamanho foram descritas 30 dias após a infecção em pesquisa desenvolvida por Dincel (2017). Este autor constatou diferença significativa na quantidade de lesões encontradas entre animais com 30 e 10 dias pós infecção, onde a presença de maiores alterações ocorreram nos animais com 30 dias pós infecção.

Nos resultados obtidos a partir da PCR convencional realizada no cérebro das 20 fêmeas prenhes distribuídas nos grupos avaliados, foi detectado DNA de *T. gondii* em apenas uma fêmea, pertencente ao grupo infectado no 1º terço gestacional.. Por conseguinte, este mesmo animal apresentou alterações macroscópicas durante a necropsia, assim como lesões inflamatórias no cérebro e na placenta foram observadas na análise histopatológica. Pesquisadores relatam que diversos fatores podem determinar a distribuição do parasito nos tecidos, dentre eles, o tempo de infecção, a cepa utilizada, dose do inóculo, assim como a espécie, idade e estado imunológico do hospedeiro (SAKAMOTO, 2009). Além disso, a detecção de DNA em apenas uma amostra pode ser explicada, provavelmente, devido à carga parasitária ter sido baixa sendo conseqüentemente, a quantidade de DNA no cérebro da mesma forma reduzida. Assim, a utilização de técnicas como PCR quantitativa em tempo real, poderia melhorar a sensibilidade de resultados relacionados a carga parasitária nos tecidos e assim confirmar a presença/ausência do DNA, mesmo em baixa concentração. A quantificação da carga parasitária será realizada, assim como outros dados experimentais (não mostrados) analisados para produção dos artigos resultantes desta pesquisa.

Resultados similares aos descritos no nossa pesquisa foram observados nas fêmeas de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados pela cepa ME49 no 1º dia de gestação e necropsiados 8 e 19 dpi. Nos cérebros de camundongos prenhes, o parasito foi raramente encontrado no período de 8dpi. Adicionalmente, esta pesquisa demonstrou que os camundongos C57BL/6 apresentaram uma maior carga parasitária de *T. gondii* em comparação com os camundongos BALB/c submetidos ao mesmo protocolo experimental (COUTINHO et al., 2012). Esses resultados vão de acordo com os descritos por Silva et al. (2010), onde estes verificaram através da avaliação da carga parasitária por PCR quantitativa em tempo real, que na fase aguda da infecção por *T. gondii* (8 dpi), a carga parasitária é baixa no cérebro enquanto que na fase crônica inicial (19 dpi) o parasitismo tecidual é aumentado.

Zenner et. al. (1998), em estudos realizados a partir de infecções experimentais por via oral com cistos de *T. gondii*, demonstra que os primeiros órgãos nos quais o parasito é

detectado seriam os mais próximos ao canal alimentar, incluindo o baço, fígado e rim, seguido dos que são altamente vascularizados, como os pulmões e por último o cérebro. Dubey (1997) descreve que o padrão de disseminação de diferentes cepas de parasitos de *T. gondii* começa pela penetração dos enterócitos e da lâmina própria intestinal, duas horas após a infecção. Em seguida, o parasito invade os pulmões e outros órgãos e a formação de cistos cerebrais começa a partir do décimo dia após a infecção. Esses dois órgãos são considerados os principais centros de reações teciduais causadas pela toxoplasmose aguda, conseqüentemente, são os órgãos mais usados para detecção DNA do parasito e confirmação desta enfermidade (SINGH, 2009). Adicionalmente, serão realizadas as análises dos demais órgãos descritos anteriormente, esses dados gerados posteriormente irão acrescentar e enriquecer o trabalho que será publicado em seguida.

Em estudos prévios realizados com fêmeas de camundongos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectados com a cepa ME49, foi possível descrever a presença do DNA de *T. gondii* no cérebro principalmente aos 18 dias de infecção independente da gestação (RESENDE et al., 2008). Já em estudo realizando bioensaio em camundongos infectados com as cepas RH e ME49 de *T. gondii* e posteriormente submetidos ao tratamento com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina, se observou resultados de PCR confirmando a presença de DNA de *T. gondii* em tecido cerebral de animais sobreviventes somente 30 dias pós-infecção (OLIVEIRA, 2007).

Pesquisa utilizando diferentes grupos experimentais com intuito de avaliar a detecção do parasito na toxoplasmose aguda e crônica constatou a presença do DNA do parasito no cérebro dos camundongos após duas semanas de infecção, enquanto que nos pulmões e íleo, amostras já apresentaram o DNA de *T. gondii* durante a fase aguda da infecção, 7 dias pós-infecção. Além do mais, dados semelhantes aos descritos na nossa pesquisa também foram constatados neste experimento, onde, estes autores também observaram que em outros dois grupos diferentes estudados, os quais foram submetidos à infecção com 2 cepas diferentes de *T. gondii* ao mesmo tempo, não foi possível detectar o DNA deste no tecido cerebral durante nenhum momento do experimento (fase aguda e crônica da toxoplasmose) (COSTA et al., 2018).

Frente à infecção por *T. gondii*, o organismo desenvolve estratégias para combater a multiplicação e disseminação do parasito pelo organismo. A resposta imune inata contra patógenos é iniciada pelos receptores *Toll-like*, no qual os TLRs de superfície (TLR 2 e

TLR 4) reconhecem lipídios de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de diversos parasitos e uma proteína semelhante à profilina de *T. gondii* (OVIEDO-BOYSO et al., 2014; YAROVINSKY, 2008). Cada TLR inicia a sinalização que culmina na ativação de vias de sinalização que regulam a expressão de citocinas, quimiocinas e interferons (KAWASAKI; KAWAI, 2014).

A expressão de TLR 2 e 4 foi avaliada na placenta das fêmeas dos quatro grupos experimentais. Observou-se que a expressão dos TLR 2 e 4 foi maior em fêmeas inoculadas no 1º terço de gestação quando comparado aos demais grupos do estudo (Figura 10). Sabe-se que os receptores tipo *Toll* desempenham um papel crítico na resposta imune inata em mamíferos. Na interface materno-fetal, os TLRs são expressos não apenas em células imunes, mas também em células não imunes, como as membranas fetais (KOGA; MOR, 2008), os trofoblastos (HOLMLUND et al., 2002; ZAREMBER; GODOWSKI, 2002; KUMAZAKI et al., 2004; ABRAHAMS; MOR, 2005) e células decíduais (KRIKUN et al., 2007; KOGA; MOR, 2008; SCHATZ et al., 2012).

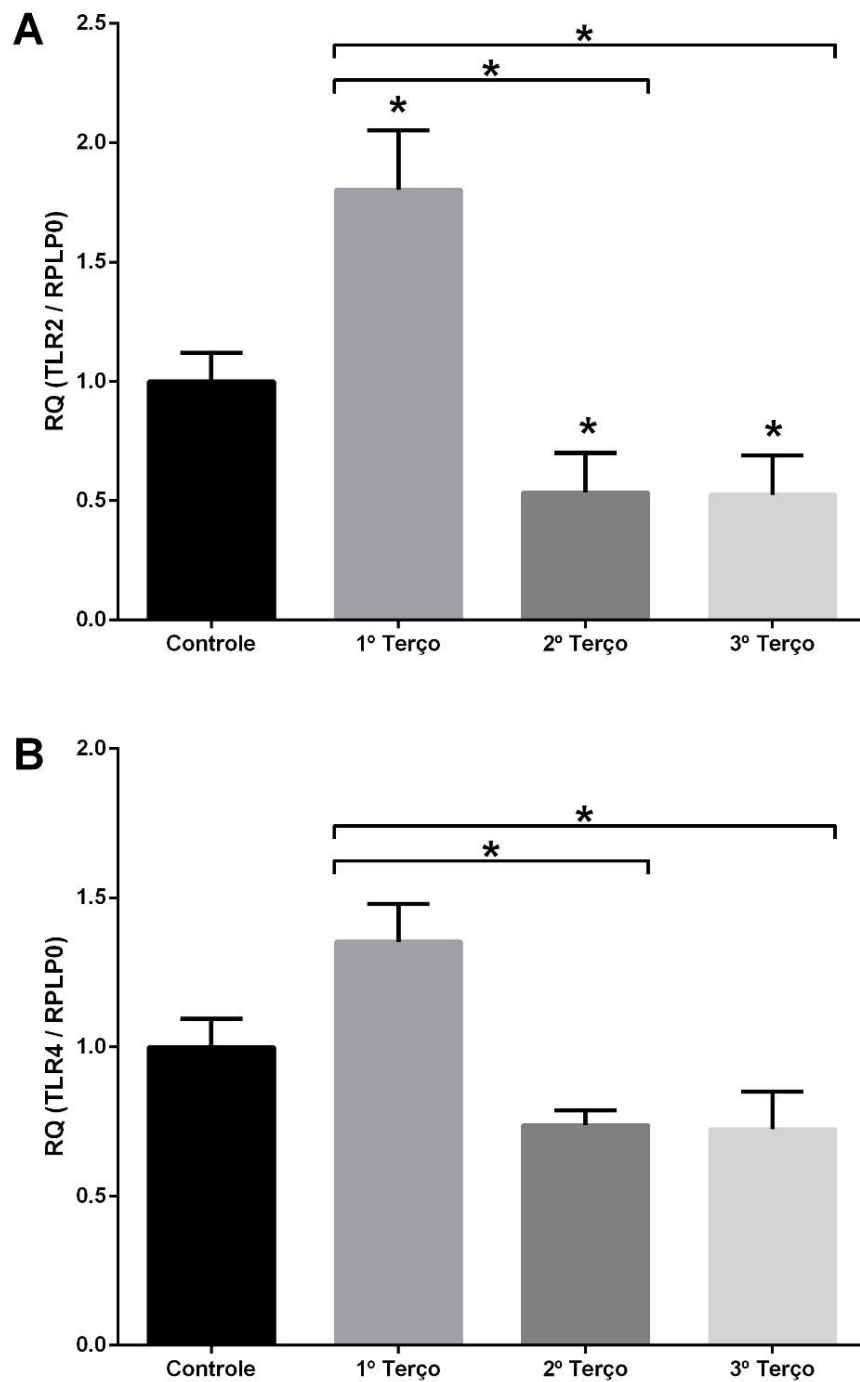


Figura 10. Expressão de TLR na placenta de camundongos C57BL/6 prenhes e inoculados com *T. gondii* em diferentes terços de gestação. Quantificação relativa de TLR2 (A) e TLR4 (B) normalizado com o gene endógeno RPLP0 (*ribosomal protein lateral stalk subunit P0*). Dados representam média \pm desvio padrão ($n \geq 13$). * $p < 0,001$ quando comparado com o controle, ou entre colchetes, após análise por Kruskal-Wallis e teste comparação múltipla de Dunn.

Em estudo avaliando a expressão de TLR 2 e 4 na placenta de camundongos durante diferentes dias de gestação (12, 16, 18, 19 dias de gestação e no pós-parto) demonstrou a expressão diminuída destas nos animais gestantes, quando comparado com o controle não gestante. Adicionalmente foi possível observar que o TLR 2 não foi expresso diferencialmente durante os diferentes dias de gestação. Em contraste, a avaliação do TLR 4 nos dias 12 e 19 demonstrou a diminuição da expressão deste no decorrer dos dias (GONZALEZ et al., 2007). No entanto, este experimento foi realizado com animais saudáveis, sem nenhuma infecção. Deste modo, podemos sugerir que a expressão aumentada de TLR observada nesta pesquisa aconteceu devido à resposta imune gerada pela invasão e multiplicação do parasito neste tecido.

Beijar et al. (2006) descreveu na sua pesquisa que a expressão do TLR4 na placenta humana durante o primeiro trimestre de gestação foi maior do que as de mulheres a termo. Resultados semelhantes foram descritos por Abrahams et al. (2004), o qual relata a expressão de TLR 2 e TLR 4 no tecido placentário durante o primeiro terço gestacional em humanos. Embora a ativação de TLR 4 resulte em uma resposta clássica caracterizada pela indução da produção de citocinas, a ativação de TLR 2 resulta na indução de morte celular trofoblástica. Esses achados sugerem que um patógeno, através do TLR-2, pode promover diretamente a morte celular trofoblástica fornecendo um novo mecanismo de patogênese pelo qual certas infecções intrauterinas podem contribuir no desencadeamento de complicações como pré-eclampsia e parto prematuro (SMITH et al., 1997; ISHIHARA et al., 2002).

Estudo comparativo entre a expressão dos TLRs 2, 4 e 9 em explantes de placenta humana infectadas com *T. gondii*, verificou que a infecção por este parasito desencadeou aumento significativo da expressão da proteína TLR 9 e secreção de IL-8, mas não afetou a expressão TLR 2 ou TLR 4 (CASTILLO et al., 2017). Observou-se nesse estudo que o parasitas não induziu um aumento significativo de IFN- γ , importante na coordenação à imunidade protetora contra a infecção por patógenos intracelulares, em particular o *T. gondii* (GOPAL et al., 2008; STURGE; YAROVINSKY, 2014). Esses dados sugerem que o *T. gondii* induz dano tecidual, podendo ser explicado pelo fato de que o parasita não induz a citocina anti-inflamatória IL-10, desencadeando uma resposta local antiparasitária prejudicada na placenta (MUÑOZ et al., 2016).

Adicionalmente, Mun et al. (2003) ressaltam a importância do TLR2 para a sobrevivência de camundongos infectados por *T. gondii*. Nesse estudo, foi observado que

camundongos TLR2-deficientes morrem no prazo de 8 dias após a infecção pelo parasito. Estes autores sugerem que os resultados observados indicam que o TLR2 é uma molécula essencial para a imunidade protetora contra a infecção por *T. gondii*. Chen et al. (2002) e Debierre-Grockiego et al. (2007), estudando o TLR 4, demonstraram que camundongos TLR4-deficientes apresentaram aumento na carga parasitária em diversos órgãos. Estes resultados ressaltam o papel desempenhado pelo TLR4 no reconhecimento do *T. gondii* e sua importância para o desenvolvimento de imunidade específica adquirida contra este protozoário.

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho, podemos concluir que:

- A realização de cruzamentos de camundongos C57BL/6 e inoculação de *T. gondii* em fêmeas durante diferentes terços gestacionais foi um modelo experimental pioneiro e parece ser confiável para o estudo da cinética de infecção durante a gestação.
- A infecção por *T. gondii* determina lesões inflamatórias e degenerativas na placenta e no cérebro, e a intensidade destas alterações são dependentes do tempo de infecção. As alterações histopatológicas foram mais evidentes nas fêmeas infectadas no segundo terço de gestação.
- A PCR convencional não consiste em um bom método para detecção de *T. gondii* no cérebro de camundongos em curto tempo de infecção.
- O tempo de infecção de 15 dias, possivelmente permite o desenvolvimento pelo hospedeiro de uma resposta imune inata, demonstrada através de uma maior expressão gênica das moléculas de TLR 2 e 4 no primeiro terço gestacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, M.; KKOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of Placental Trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 608-616, 2003.
- ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1397-1401, 2004.
- ABRAHAMS, V. M.; BOLE-ALDO, P.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; CHAIWORAPONGSA, T.; ROMERO, R.; MOR, G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4286-4296, 2004.
- ABRAHAMS, V. M.; MOR, G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. **Placenta**, v. 26, n. 7, p. 540-547, 2005.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.
- AKIRA, S.; SAITOH, T.; MATSUSHITA, K.; TAKEUCHI, O. Negative regulators in Toll-like receptor responses. **Cornea**, v. 29, n. 11, p. 13-19, 2010.
- ALMEIDA-SOUZA, F.; TANIWAKI, N. N.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, C. D. S. F. D.; CALABRESE, K. D. S.; ABREU-SILVA, A. L. Ultrastructural changes and death of *Leishmania infantum* promastigotes induced by *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.
- AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G. S.; CORREA, S. T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 207-218, 2004.
- AMATO, N. V.; MARCHI, C. R. 2002. Toxoplasmose. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Org.). **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 160- 177.
- ANDER, S. E.; RUDZKI, E. N.; ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B.; BOYLE, J. P. Human placental syncytiotrophoblasts restrict *Toxoplasma gondii* attachment and replication and respond to infection by producing immunomodulatory chemokines. **mBio**, v. 9, n. 1, p. e01678-17, 2018.
- ANSELL, J. D.; BARLOW, P. W.; MCLAREN, A. Binucleate and polyploid cells in the decidua of the mouse. **Development**, v. 31, n. 1, p. 223-227, 1974.
- ATMACA, H. T.; KUL, O.; KARAKUŞ, E.; TERZI, O. S.; CANPOLAT, S.; ANTEPLIOĞLU, T. Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like

receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. **Neuroscience**, v. 269, p. 184-191, 2014.

BABA, M.; BATANOVA, T.; KITO, K.; TAKASHIM, Y. Adhesion of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected vehicle leukocytes to capillary endothelial cells triggers timely parasite egression. **Scientific Reports**, v. 7, p. 5675, 2017.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 426-430, 2003.

BAYAT, P.; ESLAMIRAD, Z.; SHOJAEE, S. Toxoplasmosis: Experimental Vaginal Infection in NMRI Mice and Effect on Uterin, Placenta and Fetus Tissues. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n. 7, p. 595, 2013.

BEIJAR, E. C. E.; MALLARD, C.; POWELL, T. L. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. **Placenta**, v. 27, n. 2-3, p. 322-326, 2006.

BEVILACQUA, E.; HOSHIDA, M. S.; AMARANTE, A. M.; ALBIERI, A.; GOMES, S. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. A review. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 495 - 505, 2010.

BILLINGTON, W. D. Biology of the trophoblast. **Advances in Reproductive Physiology**, v. 5, p. 27-66, 1971.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

BRESCIANI, K. D. S.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A.; MORAES, F. R. Clinical parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciência Rural**, v. 31, p. 1039-1043, 2001.

BROWN, C. R.; MCLEOD, R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 10, p. 3438-3441, 1990.

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.

CABAÑAS-CORTES, M. A.; REYES-MALDONADO, E.; MONTIEL-CERVANTES, L.; DOMINGUEZ-LOPEZ, M. L.; JIMENEZ-ZAMUDIO, L.; GARCIA-LATORRE, E.

Toxoplasma gondii: effect of maternal infection in the development of lymphoid organs of BALB/c neonates. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 3, p. 279-287, 2009.

CALABRESE, K. S.; TEDESCO, R. C.; VALLE, T. Z.; BARBOSA, H. S. Serum and aqueous humour cytokine response and histopathological alterations during ocular *Toxoplasma gondii* infection in C57BL/6 mice. **Micron**, v. 39, p. 1335–1341, 2008.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, 55-70, 2012.

CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; CARRILLO, I.; LIEMPI, A.; GALLARDO, C.; GALANTI, N.; MAIA, J. D.; KEMMERLING, U. Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, n. 1, p. e12660, 2017.

CHEN, M.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; MUN, H. S.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; YANO, A. Involvement of MyD88 in host defense and the down-regulation of antiheat shock protein 70 autoantibody formation by MyD88 in *Toxoplasma gondii* infected mice. **Journal of Parasitology**, n. 88, p. 1017–1019, 2002.

CLEARY, M. D.; SINGH, U.; BLADER, I. J.; BREWER, J. L.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 3, p. 329-340, 2002.

COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 744, 2014.

COSTA, J. G. L.; TAVARES, A. T.; SILVA, D. R. C.; PINTO, L. V.; BARAVIERA, R. C. A.; NOVIELLO, M. L. M.; VITOR, R. W. A. Kinetics of parasite distribution after reinfection with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. **Experimental parasitology**, v. 184, p. 22-30, 2018.

COUPER, K. N.; NIELSEN, H. V.; PETERSEN, E.; ROBERTS, F.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J. DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. **Vaccine**, v. 21, p. 2813-2820, 2003.

COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GÂTEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c-and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-316, 2006.

COUTINHO, L. B.; GOMES, A. O.; ARAÚJO, E. C.; BARENCO, P. V. C.; SANTOS, J. L.; CAIXETA, D. R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; FERRO, E. A.; SILVA, N. M. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 4, p. 341-352, 2012.

COUTINHO, Loyane Bertagnolli. **Camundongos C57BL/6 apresentam maior índice de reabsorção fetal durante infecção por *Toxoplasma gondii* em comparação com camundongos BALB/c.** 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

DAOLIO, Gabriela Aparecida Jorge. **Caracterização do processo de diferenciação sincicial no labirinto de placentas de camundongos.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

DARCY, F.; ZENNER, L. Experimental models of toxoplasmosis. **Research in Immunology**, v. 144, n. 1, p. 16-23, 1993.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M.A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M.G.; MANSUR, D.S.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R.R.; GOLENBOCK, D.T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1129-1137, 2007.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

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

DENKERS, E.Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 193-203, 2003.

DENKERS, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

DINCEL, G. C. First description of enhanced expression of glia maturation factor-beta in experimental toxoplasmic encephalitis. **Journal of International Medical Research**, v. 45, n. 6, p. 1670-1679, 2017.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; KLUN, I.; KHAN, A.; NIKOLIĆ, A.; KNEŽEVIĆ-UŠAJ, S.; BOBIĆ, B.; SIBLEY, L. D. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. **Microbes and infection**, v. 8, n. 8, p. 2206-2212, 2006.

DOWSE, T. J.; PASCALL, J. C.; BROWN, K. D.; & SOLDATI, D. Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 747-756, 2005.

DUBEY, J. P.; MILLER, Nancy L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636-662, 1970.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradyzoites of Different Strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592-602, 1997.

DUBEY, J. P.; BRISCOE, N.; GAMBLE, R.; ZARLENGA, D.; HUMPHREYS, J. G.; THULLIEZ, P. Characterization of *Toxoplasma* and *Trichinella* isolates from muscles of black bears in Pennsylvania. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 6, p. 815-819, 1994.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, Jitender Prakash. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. Second ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DULAY, A. T.; BUHIMSCHI, C. S.; ZHAO, G.; OLIVER, E. A.; MBELE, A.; JING, S.; BUHIMSCHI, I. A. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7244-7253, 2009.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, 2002.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 155-171, 1999.

FENOY, I. M.; SANCHEZ, V. R.; SOTO, A. S.; PICCHIO, M.S.; MARTIN, V.; GOLDMAN, A. *Toxoplasma gondii* infection modulate systemic allergic immune response in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 154, p. 47-50, 2015.

FERRO, Eloisa Amália Vieira. **Estudo da interface materno-embrionária em etapas iniciais da implantação em *Calomys callosus***. 1991. 130f. Dissertação (Mestrado em Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MORTARA, R.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) trophoblast cells as host to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology research**, v. 85, n. 8-9, p. 647-654, 1999.

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

FERRO, E. A.; SILVA, D. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 7089–7094, 2002.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FLORI, P.; HAFID, J.; BOURLET, T.; RABERIN, H.; GENIN, C.; SUNG, R. T. M. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. **Journal of medical microbiology**, v. 51, n. 10, p. 871-878, 2002.

FRANCO, P. S.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; GOMES, A. O.; SILVA, A. L. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. **Placenta**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 2011.

FRANCO, P. S.; RIBEIRO, M.; LOPES-MARIA, J. B.; COSTA, L. F.; SILVA, D. A. O.; DE FREITAS BARBOSA, B.; FERRO, E. A. V. Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. **Parasitology research**, v. 113, n. 7, p. 2655-2664, 2014.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-896, 1970.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. 4, n. 10, p. 273-278, 1988.

FREYRE, A. Separation of *Toxoplasma* cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. **The Journal of Parasitology**, p. 1008-1010, 1995.

GALDINO, Daniel. **Efeito do extrato hidroalcolico de *Cassia angustifolia* na gestação de camundongos**. 2012. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, Minas Gerais. 2012,

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role CD4+ and CD8+ t lymphocytes in INF-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 286-292, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

- GIBORI, Geula. The decidual hormones and their role in pregnancy recognition. In: **Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions**. Boston: Springer, 1994. p. 217-222.
- GLASSER, S. R. Laboratory models for the study of the peri-implantation period. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 4, n. 1-2, p. 48-55, 1991.
- GONZALEZ, J. M.; XU, H.; OFORI, E.; ELOVITZ, M. A. *Toll-like* receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 197, n. 3, p. 296. e1-296. e6, 2007.
- GOPAL, R.; BIRDSELL, D.; MONROY, F. P. Regulation of toll-like receptors in intestinal epithelial cells by stress and *Toxoplasma gondii* infection. **Parasite immunology**, v. 30, n. 11-12, p. 563-576, 2008.
- GRAS, L.; WALLON, M.; POLLAK, A.; CORTINA-BORJA, M.; EVENGARD, B.; HAYDE, M.; PETERSEN, E.; GILBERT, R. European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 12, p. 172-131, 2005.
- GULERIA, I.; POLLARD, J. W. The trophoblast is a component of the innate immunosystem during pregnancy. **Nature Medicine**, v. 6, p. 589-593, 2000.
- HIRAMOTO, R. M.; GALISTEO JR, A. J.; DO NASCIMENTO, N.; DE ANDRADE JR, H. F. 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. **Vaccine**, v. 20, n. 16, p. 2072-2081, 2002.
- HOLMLUND, U.; CEBERS, G.; DAHLFORS, A. R.; SANDSTEDT, B.; BREMME, K.; EKSTRÖM, E. S.; SCHEYNIUS, A. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 145-151, 2002.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p.1561-1566, 1995.
- ISHIHARA, N.; MATSUO, H.; MURAKOSHI, H.; LAOAG-FERNANDEZ, J. B.; SAMOTO, T.; MARUO, T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 186, n. 1, p. 158-166, 2002.
- KASPER, L.; COURRET, N.; DARCHE, S.; LUANGSAY, S.; MENNECHET, F.; MINNS, L.; RACHINEL, N.; RONET, C.; BUZONI-GATEL, D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 401-409, 2004.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, v. 19, n. 1, p. 24-32, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317-337, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373, 2010.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KODJIKIAN, L. Toxoplasmosis and pregnancy. **Journal Français D'Ophthalmologie**, v. 33, p. 362-367, 2010.

KOGA, K.; MOR, G. Expression and function of Toll-like receptors at the maternal—fetal interface. **Reproductive Sciences**, v. 15, n. 3, p. 231-242, 2008.

KOGA, K.; ALDO, P.B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 35, n. 2, p. 191-202, 2009.

KRIKUN, G.; LOCKWOOD, C. J.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G.; PAIDAS, M.; GULLER, S. Expression of Toll-like receptors in the human decidua. **Histology and histopathology**, v. 22, n. 7-9, p. 847-854, 2007.

KUMAZAKI, K.; NAKAYAMA, M.; YANAGIHARA, I.; SUEHARA, N.; WADA, Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. **Human pathology**, v. 35, n. 1, p. 47-54, 2004.

LANG, C.; GROSS, U.; LÜDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 191–203, 2007.

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

LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 597-607, 1996.

LIESENFELD, O. Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 96–101, 2002.

LIM, H. J.; WANG, H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 1004-1015, 2010.

LIMONGI, J. E.; FERRO, E. A. V. Barreira placentária de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Bioscience Journal**, v. 19, n. 3, 2003.

LIPPE, Eliana Mara Oliveira. **Avaliação da expressão das isoformas da óxido nítrico sintase nas células da interface materno fetal na gestação normal e com lesão embrionária.** 2007. 79f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2007.

LIU, J.; HUANG, S.; LU, F. Galectin-3 and Galectin-9 may differently regulate the expressions of microglial M1/M2 markers and Th1/Th2 cytokines in the brains of genetically susceptible C57BL/6 and resistant BALB/c mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Immunology**, v.9, p.1648, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÜDER, C. G. K.; BOHNE, W.; SOLDATI, D. Toxoplasmosis: a persisting challenge. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 460-463, 2001.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 5, p. 244-247, 2001.

MAROBIN, L.; FLÔRES, M. L.; RIZZATTI, B. B.; SEGABINAZI, S. D.; LAGAGGIO, V. R. A.; GRIGULO, M.; SCALCO, M. A. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) em diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 1, p. 5-9, 2004.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY JR, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 338, p. 394-397, 1997.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P-30). **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 11-20, 1994.

MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 639-41, 1998.

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

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; LA REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 8, p. 4574-4584, 2001.

MOSSMAN, H. W. The thecal gland and its relation to the reproductive cycle. A study of the cyclic changes in the ovary of the pocket gopher, *Geomys bursarius* (Shaw). **American Journal of Anatomy**, v. 61, n. 2, p. 289-319, 1937.

MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; PIAO, L. X.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; ISHIKURA, H.; YANO, A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **International Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1081-1087, 2003.

- MUÑOZ, L.; CASTILLO, C.; CARRILLO, I.; SALINAS, A.; LIEMPI, A.; DROGUETT, D., ... & KEMMERLING, U. The ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* is mediated by different toll-like receptors. **Placenta**, v. 45, p. 86, 2016.
- MUNTENER, M.; HSU, Y. C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Cells Tissues Organs**, v. 98, n. 3, p. 241-252, 1977.
- NAKAMOTO, N.; KANAI, T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 221, 2014.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 147-156.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. Capítulo 25. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 177-188.
- NORWITZ, E. R.; SCHUST, D. J.; FISHER, S. J. Implantation and the survival of early pregnancy. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 19, p. 1400-1408, 2001.
- ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C.; BACHIEGA, T. F.; BÚFALO, M. C.; ARAÚJO JR, J. P.; SFORCIN, J. M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 8, p. 1141-1146, 2010.
- OVIEDO-BOYSO, J.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Collaborative action of Toll-like and NOD-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria. **Mediators of inflammation**, 2014.
- PARR, M. B.; TUNG, H. N.; PARR, E. L. The ultrastructure of the rat primary decidual zone. **American Journal of Anatomy**, v. 176, n. 4, p. 423-436, 1986.
- PARKER, S. J.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 84, n. 2, p. 207-212, 1991.
- PENG, H. J.; CHEN, X. G.; LINDSAY, D. S. A Review: Competence, Compromise, and Concomitance - Reaction of the Host Cell To *Toxoplasma gondii* Infection and Development. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 620-628, 2011.
- PENG, J.; LIN, X.; LIN, H.; CHEN, S.; LIU, J.; GUO, Z.; LIANG, Y.; HUANG, S.; LU, F. Up-regulated TLR2 and TLR4 expressions in liver and spleen during acute murine *T. gondii* infection. **Parasitology Research**, v. 115, n. 12, p. 4681-4686, 2016.
- PEREIRA, A. V.; GÓIS, M. B.; LERA, K. R. J. L.; FALKOWSKI-TEMPORINI, G. J.; MASSINI, P. F.; DROZINO, R. N.; ALEIXO, D. L.; MIRANDA, M. M.; DA SILVA WATANABE, P.; CONCHON-COSTA, I.; DA COSTA, I. N.; DOS ANJOS NETO FILHO, M.; DE ARAÚJO, S. M.; PAVANELLI, W. R. Histopathological lesions in encephalon and heart of mice infected with *Toxoplasma gondii* increase after *Lycopodium clavatum* 200dH treatment. **Pathology-Research and Practice**, v. 213, n. 1, p. 50-57, 2017.

PFAFF, A. W.; CANDOLFI, E. New insights in toxoplasmosis immunology during pregnancy. Perspective for vaccine prevention. **Parassitologia**, v. 50, n. 1-2, p. 55-58, 2008.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 6, p. 267-279, 1986.

PINEDA, A.; VERDIN-TERÁN, S. L.; CAMACHO, A.; MORENO-FIERROS, L. Expression of toll-like receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 is increased in placentas from patients with preeclampsia. **Archives of medical research**, v. 42, n. 5, p. 382-391, 2011.

POPIEL, I.; GOLD, M. C.; BOOTH, K. S. Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. **The Journal of Parasitology**, p. 330-332, 1996.

RADSTAKE, T. R.; ROELOFS, M. F.; JENNISKENS, Y. M.; OPPERS-WALGREEN, B.; VAN RIEL, P. L.; BARRERA, P.; JOOSTEN, L. A.; VAN DEN BERG, W. B. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- γ . **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3856-3865, 2004.

RESENDE, M. G.; FUX, B.; CAETANO, B. C.; MENDES, E. A.; SILVA, N. M.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 85-99, 2008.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis - prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458-472, 2006.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 7, p. 538, 2001.

SÁ, Silvio Gomes. **Transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em camundongos experimentalmente infectados com oocistos da cepa ME49**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2011.

SAKAMOTO, Keila Priscilla. **Detecção imunoistoquímica de linfócitos T (CD3+) e B (CD79+) no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e presença de anticorpos séricos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum***. 2009. 79 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A laboratory Manual, Volume 1**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, L. S.; DA SILVA MOL, J. P.; DE MACEDO, A. A.; SILVA, A. P. C.; DOS SANTOS RIBEIRO, D. L.; SANTOS, R. L.; DE CARVALHO NETA, A. V. Transcription of non-classic Major Histocompatibility Complex (MHC) class I in the bovine placenta

throughout gestation and after *Brucella abortus* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 167, n. 3, p. 166-170, 2015.

SASMONO, R. T.; OCEANDY, D.; POLLARD, J. W.; TONG, W.; PAVLI, P.; WAINWRIGHT, B. J.; OSTROWSKI, M. C.; HIMES, S. R.; HUME, D. A. A macrophage colony-stimulating factor receptor green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. **Blood**, v. 101, p. 1155-1163, 2003.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1261-1274, 1997.

SCHATZ, F.; KAYISLI, U. A.; VATANDASLAR, E.; OCAK, N.; GULLER, S.; ABRAHAMS, V. M.; ... & LOCKWOOD, C. J. Toll-like receptor 4 expression in decidual cells and interstitial trophoblasts across human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 68, n. 2, p. 146-153, 2012.

SHIBOLET, O.; PODOLSKY, D. K. TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 6, p. 1469-1473, 2007.

SHIRAHATA, T.; MUROYA, N.; OHTA, C.; GOTO, H.; NAKANE, A. Correlation between increased susceptibility to primary *Toxoplasma gondii* infection and depressed production of gamma interferon in pregnant mice. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 1, p. 81-91, 1992.

SILVA, F. W. S.; ALVES, N. D.; Albano, S. S.; AMÓRA, F. H. V. T.; ACCIOLY, M. P.; CARVALHO, C. G.; NÓBREGA, R. M.; FILGUEIRA, K. D.; FEIJÓ, F. M. C. Toxoplasmose: uma revisão. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 71-77, 2006.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 893-898, 2009.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood–brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 167-177, 2010.

SILVA, A. P. C.; COSTA, E. A.; MACÊDO, A. A.; MARTINS, T. M.; BORGES, A. M.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Transcription of pattern recognition receptors and abortive agents induced chemokines in the bovine pregnant uterus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, p. 248–256, 2012.

SINGH, H. **Expression, Characterization and Immunoprophylactic Evaluation of Toxoplasma Gondii Specific SAG2 and GRA 5 Proteins**. 2009. Tese de Doutorado. IVRI.

SMILEY, S. T.; LANTHIER, P. A.; COUPER, K. N.; SZABA, F. M.; BOYSON, J. E.; CHEN, W.; JOHNSON, L. L. Exacerbated susceptibility to infection-stimulated

immunopathology in CD1d-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 7904-7911, 2005.

SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. MALCOLM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 177, n. 6, p. 1395-1401, 1997.

SOARES, M. J.; CHAPMAN, B. M.; RASMUSSEN, C. A.; DAI, G.; KAMEI, T.; ORWIG, K. E. Differentiation of trophoblast endocrine cells. **Placenta**, v. 17, n. 5-6, p. 277-289, 1996.

SOARES, R. M. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 17-19, 2004.

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and immunity**, v. 82, n. 8, p. 3090-3097, 2014.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516-518, 1988.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TEDESCO, R. C.; SMITH, R. L.; CORTE-REAL, S.; CALABRESE, K. S. Ocular toxoplasmosis in mice: comparison of two routes of infection. **Parasitology**, v. 131, p. 303-307, 2005.

TEDESCO, R. C.; VITOR, R. W.; BRANDÃO, G. P.; CALABRESE, K. S. Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. **Micron**, v. 38, n. 7, p. 729-733, 2007.

TEDFORD, E.; MCCONKEY, G. Neurophysiological Changes Induced by Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. **Pathogens**, v. 6, p. 19, 2017.

TENTER, A. M. Epidemiological importance of animals in the transmission of *Toxoplasma*. **Parasitology International**, n. 47, p. 82, 1998.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; CEDILLO-PELAEZ, C.; RICO-TORRES, C. P.; BESNE-MERIDA, A.; GARCIA-VAZQUEZ, F.; SALDANA, J. I.; CORREA, D. Mouse model of congenital infection with a non-virulent *Toxoplasma gondii* strain: Vertical transmission, "sterile" fetal damage, or both?. **Experimental parasitology**, v. 166, p. 116-123, 2016.

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology**, v. 20, n. 3, p. 180-193, 2005.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 409-437, 2006.

WILSON, D. C.; GROTENBREG, G. M.; LIU, K.; ZHAO, Y.; FRICKEL, E. M.; GUBBELS, M. J.; PLOEGH, H. L.; YAP, G. S. Differential regulation of effector-and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000815, 2010.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunology letters**, v. 119, n. 1-2, p. 17-21, 2008.

ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **The journal of immunology**, v. 168, n. 2, p. 554-561, 2002.

ZENNER, L.; DARCY, F.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 86-94, 1998.

ZHANG, R.; ZHANG, H.; LIU, X.; FU, Q.; XU, X.; HU, X. The immunoprotective role of interleukin-10 in abnormal pregnancy outcome induced by *Toxoplasma gondii* infection. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 73, n. 3, p. 223-229, 2012.