

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

**Influência de *Toxoplasma gondii* (cepas RH e ME49) na
modulação da apoptose de células trofoblásticas (Linhagem
BeWo)**

MARIANA BODINI ANGELONI

UBERLÂNDIA/MG
Abril - 2013

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

**Influência de *Toxoplasma gondii* (cepas RH e ME49) na
modulação da apoptose de células trofoblásticas (Linhagem
BeWo)**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor.

MARIANA BODINI ANGELONI

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia/MG
Abril – 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A584i Angeloni, Mariana Bodini, 1984-
2013 Influência de *Toxoplasma gondii* (cepas RH e ME49) na modula-
ção da apoptose de células trofoblásticas (Linhagem BeWo) / Mariana
Bodini Angeloni. -- 2013.
93 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Toxoplasmo-
se congênita - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Universidade Fe-
deral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Para-
sitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

“... A folha se descobriu a perder a cor, a ficar cada vez mais frágil. Havia sempre frio e a neve pesava sobre ela. E quando amanheceu veio o vento que arrancou a folha de seu galho. Não doeu. Ela sentiu que flutuava no ar, muito serena. E, enquanto caía, ela viu a árvore inteira pela primeira vez. Como era forte e firme! Teve certeza de que a árvore viveria por muito tempo, compreendeu que fora parte de sua vida. E isso deixou-a orgulhosa. A folha pousou num monte de neve. Estava macio, até mesmo aconchegante. Naquela nova posição, a folha estava mais confortável do que jamais se sentira. Ela fechou os olhos e adormeceu. Não sabia que a folha que fora, seca e aparentemente inútil, se juntaria com água e serviria para tornar a árvore mais forte. E, principalmente, não sabia que ali, na árvore e no solo, já havia planos para novas folhas na primavera.”

Leo Buscaglia

Dedicatória

É com muita satisfação que encerro essa etapa da minha vida. Agraço a Deus e a Nossa Senhora pela proteção e por todas as oportunidades que colocaram na minha vida. E pela família tão maravilhosa que eu tenho.

Dedico essa conquista às pessoas mais importantes da minha vida: minha família. Aos meus pais, Edson e Silvia, que ao longo de toda minha vida me ensinaram, com o exemplo, a ter caráter e honestidade. Me ensinaram que nem sempre a vida é fácil, mas que temos sempre que lutar com a cabeça erguida, fazendo o melhor de nós. Muito obrigada por todo o esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui, sem vocês essa vitória não seria possível. Ao meu irmão Edson, exemplo de otimismo e de enxergar as coisas sempre pelo lado positivo, obrigada pela amizade e companheirismo e por fazer minha vida muito mais alegre. Ao meu marido Wagner, meu companheiro de todas as horas, por todo o apoio, compreensão, amor e por fazer minha vida ainda mais feliz.

Vocês são minha base, a razão da minha vida! Amo muito vocês.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora, Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório durante todos esses anos. Muito obrigada pelo carinho, pelo apoio, pela confiança e pela autonomia que sempre me deu para que eu pudesse desenvolver esse trabalho. Essa conquista também é sua. Queria te agradecer também por toda a amizade e ajuda, eu aprendi e cresci muito, tanto profissional quanto pessoalmente, nesses anos de convívio com você. De coração, muito obrigada!

*À Dra. Neide Maria Silva, pela grande contribuição que deu a esse trabalho, quando eu ainda estava no mestrado, com a ideia de usar a cepa ME49 de *T. gondii*. Gostaria de te agradecer também por me permitir usar os equipamentos do seu laboratório e ceder seus reagentes todas as vezes que precisei. Muito obrigada.*

À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, que além de ser um exemplo para mim, contribuiu muito para a melhoria desse trabalho. Muito obrigada pelas sugestões ideias e correções e por todas as vezes que você me ajudou nas reações de ELISA.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, por me ensinar a fazer citometria de fluxo e pela boa vontade que sempre teve em analisar minhas amostras.

Ao Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por toda a ajuda com a citometria de fluxo e pela paciência em me ajudar com as análises. E a Dra. Ana Cláudia Pajuaba, pela imensa boa vontade de ficar comigo no citômetro de fluxo. Muito obrigada.

À Bellisa de Freitas Barbosa, pela imensa ajuda com as reações de Western blotting e por todas as outras contribuições que você deu a esse trabalho.

À Pâmela e à Andressa, pela imensa ajuda durante e a execução desse trabalho. Muito obrigada por estarem sempre disponíveis para me ajudar e me ajudaram muito. Pâmela, sem sua ajuda essa etapa final não teria sido possível. Andressa querida, muito obrigada pelo carinho e pela amizade tão verdadeira e que se estende fora do ambiente do laboratório. Vocês são pessoas especiais pelas quais eu tenho um carinho enorme. Muito obrigada!

As demais “meninas do laboratório”, Angelica, Bellisa, Priscila, Mayara, Janice, Leticia, Celene, Karine e Alessandra: muito obrigada por toda ajuda na execução desse trabalho e, principalmente, por todo o carinho, amizade, compreensão e pelos momentos de descontração que tornaram o trabalho no laboratório muito mais prazeroso. Torço muito pelo sucesso de vocês e tenho um enorme carinho por cada uma de vocês.

Aos amigos da Histologia: Ester, Rosiane, Loyane, Paulo Victor, Mario, Layane, Rômulo, Poliana, Eliete, Mariane, Fabricio e Juscélia, muito obrigada pela agradável convivência e por toda a ajuda nos momentos em que precisei.

Aos meus queridos amigos Azul, Isabel, Fernanda, Márcia e Lorena, que mesmo não estando diariamente comigo fazem parte da minha vida e sei que posso sempre contar com vocês. Muito obrigada pela amizade e pelos momentos alegres quando nos encontramos. Adoro vocês.

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

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPq. Em especial à FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado.

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”***

Antoine de Saint-Exupéry

Sumário

Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.2 Formas infectantes e ciclo biológico.....	13
1.3 Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1.4 Resposta imune a <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.5 Toxoplasmose.....	20
1.6 Infecção por <i>T. gondii</i> durante a gestação: Toxoplasmose congênita.....	22
1.7 Apoptose.....	24
1.7.1 Apoptose em células trofoblásticas.....	28
1.7.2 Apoptose e infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	30
1.8 Células de coriocarcinoma humano (Linhagem BeWo).....	33
2. Justificativa.....	35
3. Objetivos.....	36
4. Material e métodos.....	37
4.1 Cultura de células trofoblásticas BeWo.....	37
4.2 Manutenção da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	37
4.2.1 Manutenção <i>in vivo</i>	37
4.2.2 Manutenção <i>in vitro</i>	38
4.3 Manutenção da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	38
4.4 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de <i>T. gondii</i>	39
4.4.1 Dosagem das citocinas MIF, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β 1 por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de captura.....	39
4.4.2 Dosagem das citocinas IL-6 e IL-17A por citometria de fluxo.....	41
4.5 Análise de incidência de apoptose em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de <i>T. gondii</i>	41
4.5.1 Imuno-histoquímica para detecção de apoptose utilizando o anticorpo M30.....	42
4.5.2 Análise da incidência de apoptose.....	43
4.6 Análise da expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de <i>T. gondii</i>	43

4.6.1 Citometria de fluxo para análise da expressão de Fas/CD95.....	43
4.7 Experimento para detecção de proteínas de sinalização intracelular em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de <i>T. gondii</i>	44
4.7.1 Western blotting para detecção das proteínas ERK1/2 fosforilada e survivina (IAP).....	45
4.8 Análise Estatística.....	46
5. Resultados.....	47
5.1 A produção de citocinas por células BeWo é diferentemente modulada após a infecção com as cepas RH ou ME49 de <i>T. gondii</i>	47
5.2 Células BeWo infectadas com a cepa de <i>T. gondii</i> de alta virulência RH apresentam menores índices de apoptose mesmo na presença das citocinas MIF, TNF- α e IFN- γ	48
5.3 Células BeWo infectadas com a cepa de moderada virulência ME49 apresentam menores índices de apoptose após o tratamento com IL-6, TGF- β 1 e IL-10.....	50
5.4 A expressão do receptor de morte Fas/CD95 é maior em células BeWo infectadas com a cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	51
5.5 O aumento da apoptose em células BeWo infectadas com a cepa ME49 de <i>T. gondii</i> e/ou tratadas com as citocinas MIF, TNF- α e IFN- γ está associado ao aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95.....	54
5.6 O menor índice de apoptose em células BeWo após o tratamento com as citocinas IL-6, IL-10 e TGF- β 1 está associado com a menor expressão do receptor de morte Fas/CD95.....	55
5.7 A expressão relativa da proteína ERK1/2 fosforilada é maior em células BeWo infectadas com a cepa RH de <i>T. gondii</i> , após 24 horas de infecção.....	56
6. Discussão.....	58
7. Conclusões.....	69
8. Figuras.....	70
9. Referências Bibliográficas.....	81
Anexo.....	93

Resumo

Durante a gestação existe um equilibrado controle dos processos de proliferação de células trofoblásticas e apoptose. Um desequilíbrio entre estes dois eventos pode promover alterações funcionais no desenvolvimento placentário e comprometer o sucesso gestacional. A infecção por *Toxoplasma gondii* é capaz de modular a apoptose de células trofoblásticas e essa modulação é dependente da virulência da cepa de *T. gondii*. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a apoptose de células trofoblásticas BeWo, determinar a produção de citocinas por estas células infectadas com a cepa de alta virulência RH ou com moderada virulência ME49 de *T. gondii*. Além disso, analisamos a expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células BeWo após a infecção pelas duas cepas de *T. gondii* e tratamentos com citocinas pró e anti-inflamatórias. Para isso, células foram infectadas com a cepa RH ou ME49, na proporção de cinco parasitos por célula, por 2 e 24 horas, e os sobrenadantes coletados para determinação da produção de citocinas. Além disso, as células foram tratadas com diferentes citocinas, infectadas com as cepas de *T. gondii* e analisadas quanto ao índice de apoptose por imunohistoquímica, e a expressão do Fas/CD95 por citometria de fluxo. Western blotting foi realizado para detecção das proteínas intracelulares ERK1/2 e survivina (IAP). Nos dois tempos de infecção analisados, células infectadas com a cepa ME49 secretaram, predominantemente, um perfil de citocinas pró-inflamatórias, enquanto em células infectadas com a cepa RH a secreção de citocinas anti-inflamatórias foi maior. A incidência da apoptose em células BeWo está associada tanto com a cepa do parasito, como ao tratamento das citocinas. A expressão do Fas/CD95 foi maior em células infectadas com a cepa ME49, enquanto a fosforilação da proteína ERK1/2 foi maior em células infectadas com a cepa RH. Esses resultados indicam que, em células BeWo, a incidência de apoptose está associada com o tipo de cepa do parasito e, provavelmente, relaciona-se com um mecanismo de evasão de *T. gondii*.

Abstract

During pregnancy was observed a control in trophoblastic cell proliferation and apoptosis. However, alterations of apoptosis during pregnancy are associated with abnormal placental morphology and function. *Toxoplasma gondii* is able to modulate trophoblastic cell apoptosis and this modulation is associated with the strain type of the parasite. Therefore the aim of this study was measure the production of cytokines by trophoblastic cells (BeWo cell line), infected with a highly virulent RH strain or a moderately virulent ME49 strain of *T. gondii*. Also, were analyzed the apoptosis index and death receptor Fas/CD95 expression in trophoblastic cells after infection with both strain types of *T. gondii* and treated with different cytokines. For this, cells were infected with RH or ME49 strain at 5 parasites: cell ratio, for 2 and 24 hours, the supernatants were collected and the cytokines production was measured. Besides that, cells were treated with pro and anti-inflammatory cytokines, infected with both strain types of *T. gondii* and were analyzed for apoptosis index by immunohistochemistry and for Fas/CD95 expression by flow cytometry. Besides that western blotting for the detection of the proteins ERK1/2 and survivin (IAP) were done. In both times of infection analyzed ME49-infected BeWo cells exhibited a predominantly pro-inflammatory response profile, whereas cells infected with RH strain showed a higher production of anti-inflammatory cytokines. Besides that, were observed that the incidence of apoptosis is related with strain types that cells were infected and with the cytokine that cells were treated. Moreover, Fas/CD95 expression was higher in cells infected with ME49 strain, whereas the phosphorylation of ERK1/2 was higher in cells infected with RH strain. These results indicate that in BeWo cells the incidence of apoptosis is associated to strain type of the parasite as a potential evasion mechanism for the *T. gondii* survival.

1. Introdução

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito cosmopolita pertencente ao filo Apicomplexa. Caracteriza-se por ser um parasito intracelular obrigatório com capacidade de infectar amplo espectro de hospedeiros, incluindo todos os animais de sangue quente e alguns invertebrados (DUBEY, 2004; PENG et al., 2011). *T. gondii* foi descrito no mesmo ano em dois países diferentes, Splendore (1908) descreveu a espécie em coelhos, no Instituto Biológico de São Paulo, no Brasil, Nicolle & Manceaux (1908) no roedor africano *Ctenodactylus gundi*, no Instituto de Pasteur da Tunísia (DUBEY et al., 2012).

T. gondii possui estrutura alongada com forma curvilínea ou crescente, pode também apresentar em formato oval, indicando o início do processo de divisão celular (SOUZA et al., 2010). Há presença de um núcleo, situado no meio do parasito ou mais próximo da extremidade posterior e demais organelas típicas de células eucariontes, além de outras típicas do parasito. Na região anterior do parasito localiza-se o aparelho apical, que consiste em uma prega na membrana plasmática que delimita uma depressão central e, logo abaixo dessa depressão, há uma organela chamada conóide. Além de manter a forma do parasito estas estruturas estão envolvidas com a motilidade e direcionamento de vesículas secretórias durante o mecanismo de invasão (DUBEY, et al., 1998; HU et al., 2006; DUPONT et al., 2012).

Toxoplasma gondii possui três organelas secretórias especiais que estão relacionadas com a invasão do parasito à célula hospedeira, essas organelas são as micronemas, as roptrias e os grânulos densos (PENG et al., 2011). As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas e localizam-se na região apical do parasito, abaixo do complexo da membrana interna. Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfície da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; SOUZA et al.,

2012). Especificamente, a proteína MIC-2 está presente em todos os estágios invasivos do parasito e possui importante papel no reconhecimento da célula hospedeira e nos movimentos que o parasito realiza para a invasão celular (SIBLEY, 2004; SIBLEY, 2010).

As roptrias são encontradas na região anterior do núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas e estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira. Seu conteúdo proteico é liberado durante a invasão propriamente dita do parasito (GUBBELS; DURAISINGH, 2012). Além disso, a liberação do conteúdo das roptrias participa da formação do vacúolo parasitóforo, ficando associadas a ele e garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo, além de atuarem no recrutamento de mitocôndrias (CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008). A primeira proteína liberada pelas roptrias a ser identificada foi a ROP-2, proteína transmembrânica do vacúolo parasitóforo e que fica exposta no citoplasma da célula hospedeira. A ROP-2 possui importante função, uma vez que esta proteína medeia a associação das mitocôndrias da célula hospedeira ao vacúolo parasitóforo (HAJJ et al., 2006). As proteínas das roptrias são importantes marcadores de virulência de *T. gondii* (BRADLEY; SIBLEY, 2007; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Além das roptrias e micronemas, *T. gondii* também apresenta no citoplasma estruturas envoltas por membranas de conteúdo elétron-denso. Tais estruturas denominam-se grânulos densos e contém uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares. Uma das funções destes grânulos é a liberação de glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, possibilitando ao parasito evadir das respostas da célula hospedeira, como a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; SOUZA et al., 2010).

T. gondii, assim como outros parasitos do filo Apicomplexa, invade a célula alvo através de mecanismo ativo, diferentemente da forma de invasão da maioria dos microorganismos intracelulares. Vírus e bactérias intracelulares necessitam da participação da célula hospedeira através de via endocíticas ou fagocíticas, ao contrário, *T. gondii* penetra

ativamente na célula do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2012). O processo de invasão é rápido e leva cerca de 5-30 segundos e inicia-se com o reconhecimento do parasito à célula alvo. Em seguida, há adesão na região apical do parasito à membrana plasmática da célula hospedeira, por meio das proteínas adesivas secretadas pelas micronemas. Após a adesão, as roptrias iniciam a liberação de enzimas proteolíticas que auxiliam o parasito na invasão propriamente dita da célula hospedeira. Esse processo de invasão resulta na formação de um vacúolo parasitóforo, o qual é estruturado a partir da membrana plasmática da célula hospedeira (SIBLEY, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A penetração celular de *T. gondii* se dá através de um processo de motilidade denominado "gliding", que consiste de movimentos espiralares do parasito e independem da maquinaria da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006; SIBLEY, 2010). No entanto, estudos realizados em culturas de células infectadas por *T. gondii*, demonstraram que durante a proliferação do parasito e o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo há alterações na distribuição de elementos do citoesqueleto da célula hospedeira (LI et al., 2006). Além dessas alterações, *T. gondii* interfere em diversos mecanismos da célula hospedeira, como a regulação da glicólise, metabolismo de lipídios e colesterol, regulação do ciclo celular e apoptose (LÜDER et al., 2009).

1.2 Formas Infectantes e Ciclo Biológico

Toxoplasma gondii possui três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os taquizoítas apresentam-se na forma oval ou crescente, possuem uma das extremidades mais afilada e a outra arredondada. (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Essa forma infectante é a de multiplicação rápida do parasito, constituindo a forma invasiva de *T. gondii*, responsável pelas manifestações da fase

aguda da infecção. Nesta fase podem ocorrer as manifestações clínicas da toxoplasmose (PENG et al., 2011).

Com o início da resposta imune do hospedeiro há o estabelecimento de uma infecção crônica caracterizada pela conversão de taquizoítas em bradizoítas (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os bradizoítas são morfologicamente semelhantes aos taquizoítas; apresentam, contudo, uma taxa de multiplicação lenta e expressam algumas moléculas estágio-específicas, como BAG-1, CST-I e LDH2. Essa forma infectante de *T. gondii* é considerada a forma de resistência do parasito sendo encontrada no interior de cistos que são formados nos tecidos do hospedeiro. Esses cistos possuem variações no tamanho, medindo de 5 a 70µm e podem conter de centenas a milhares de bradizoítas em seu interior (DUBEY, 2004; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Os cistos podem permanecer nos tecidos por toda a vida do hospedeiro. No entanto, em casos de imunossupressão, a infecção pode passar por um processo de reagudização e os bradizoítas voltam a se multiplicar rapidamente, são liberados e há disseminação no organismo sob a forma de taquizoítas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Os esporozoítas são encontrados em oocistos, são esféricos que medem cerca de 10-12µm e possuem uma parede dupla muito resistente ao meio ambiente. Após um período de 7 a 21 da ingestão de parasitos pelos felídeos haverá a liberação de oocistos pelas fezes destes animais. Após a liberação, estes oocistos são imaturos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Em condições ambientais favoráveis haverá a esporulação dos oocistos com o surgimento de dois esporocistos no interior, com quatro esporozoítos cada, tornando-se infectantes (DUBEY, 2004).

O ciclo biológico de *T. gondii* se processa em duas fases distintas: assexuada e sexuada (**Figura 1**). Os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos

porque apresentam a fase coccidiana do ciclo, na qual ocorre uma etapa assexuada (merogonia) e outra sexuada (gamogonia). Já os outros animais, como demais os mamíferos e aves, possuem apenas o ciclo assexuado do parasito e são considerados hospedeiros intermediários de *T. gondii* (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004; ESCH; PETERSEN, 2013).

Os felídeos podem se contaminar ao ingerir cistos teciduais contendo bradizoítas, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início à fase enteroepitelial do ciclo, que ocorre em células epiteliais do intestino delgado desses animais (DUBEY, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012).

O ciclo induzido pela ingestão de bradizoítas é o melhor conhecido. Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, inicia-se a fase coccidiana do ciclo. A parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago desses animais, promovendo a liberação de bradizoítas que penetram nas células do estômago e do intestino. Nas células epiteliais do intestino, há o início da etapa assexuada do ciclo, na qual os parasitos começam a se multiplicar pelo processo de endodiogenia (merogonia). Há então a formação de merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, conjunto que recebe o nome de esquizonte maduro (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A etapa sexuada do ciclo coccidiano se inicia quando ocorre o rompimento da célula infectada, com consequente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras células epiteliais e se modificam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta, presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa envolta do zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto com as fezes dos felídeos (DUBEY, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A maturação do oocisto ocorre no meio externo, em um período de 1 a 5 dias após a eliminação. Essa maturação ocorre pelo processo denominado esporogonia, que dá origem a esporozoítos no interior dos oocistos, tornando-os infectantes aos hospedeiros (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Hospedeiros intermediários, como a espécie humana, podem adquirir a infecção por diferentes maneiras. Por meio da ingestão de oocistos, presentes no solo e que podem contaminar água e alimentos; ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas; ou pelo contato com taquizoítas em transfusões de sangue, transplantes de órgãos contaminados, acidentes laboratoriais e infecções transplacentárias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; JONES; DUBEY, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013).

Uma vez que o hospedeiro intermediário se infecta com uma das formas de *T. gondii*, o parasito sofre intensa multiplicação e penetra em vários tipos celulares do organismo hospedeiro, local onde o parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica por endodiogenia formando novos taquizoítas. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células. Essa fase proliferativa de taquizoítas é caracteriza a fase aguda da toxoplasmose. Com a ativação de mecanismos imunológicos do hospedeiro, ocorre diminuição da quantidade de parasitos circulantes no organismo e, alguns taquizoítas, evoluem para bradizoítas com a formação de cistos, característicos da fase crônica da doença. Se não houver alterações no sistema imunológico, essa fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY et al., 2012).

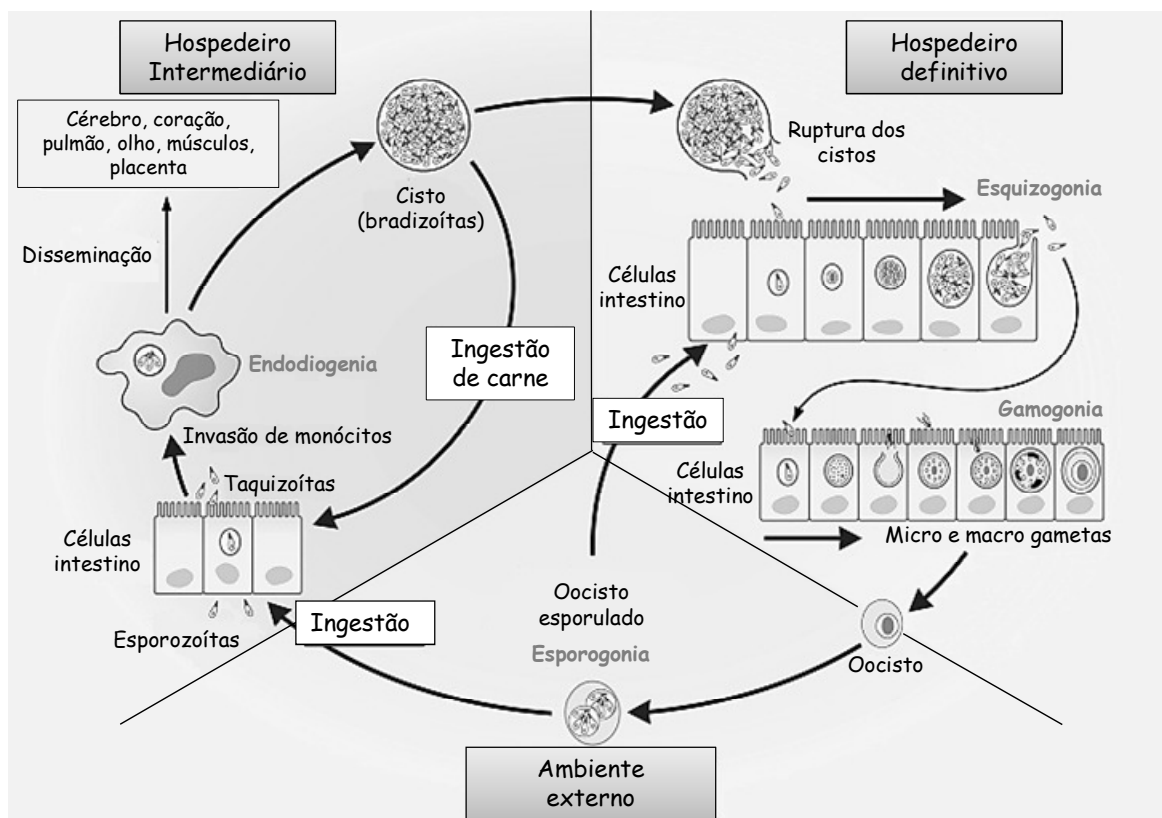


Figura 1: Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii* (Retirado e adaptado de ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.3 Cepas de *Toxoplasma gondii*

As cepas de *T. gondii* são classificadas em dois principais tipos, as chamadas cepas dominantes cujos genótipos já foram identificados e, as cepas consideradas exóticas ou atípicas, cujos genótipos diferem das cepas dominantes (VILLENNA et al., 2004; KHAN et al., 2011; SU et al., 2012).

A estrutura clonal das cepas dominantes é composta por um baixo nível de diferenças genéticas, sendo essa diferença de 1 a 2% na sequência de DNA (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Existem três linhagens clonais dominantes de *T. gondii*, as chamadas cepas dos tipos I, II e III (SAEIJ et al., 2005). A patogenia dessas cepas foi determinada em camundongos sendo que as cepas de tipo I (RH, CAST e VEL) são consideradas de alta virulência, pois causam infecções letais nesses animais. As cepas de tipo II (ME49, PDS e

PLK) são consideradas de moderada virulência e as cepas do tipo III (CEP e VEG) são ditas de baixa virulência, já que a infecção causada por este tipo clonal é controlada pelo sistema imunológico dos camundongos e a infecção tende a cronificar (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; SAEIJ et al., 2005; STUTZ et al., 2012).

Estudos demonstram que as diferenças nas manifestações clínicas da infecção por *T. gondii* provavelmente estejam associadas ao tipo de cepa do parasito (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Em humanos, as cepas do tipo I estão associadas às manifestações clínicas graves da toxoplasmose, incluindo manifestações oculares atípicas (SAEIJ et al., 2005). Já as cepas do tipo II são mais comuns nos casos de toxoplasmose congênita e em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (SIBLEY et al., 2009). Além disso, estudos demonstram que as diferenças na virulência entre as cepas de *T. gondii* estão associadas com fatores de virulência que cada cepa possui e com a capacidade desses fatores de virulência em interferir, de diferentes formas, nas vias de sinalização intracelulares da célula hospedeira (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Além das três linhagens clonais de cepas consideradas dominantes, há uma grande variedade de cepas que não pertencem a essas linhagens clonais do parasito, são as chamadas cepas recombinantes. Essas linhagens são resultado de recombinação genética e representam uma mistura dos três genótipos já identificados como sendo as cepas dominantes de *T. gondii* (KHAN et al., 2011; SU et al., 2012). Essas cepas são encontradas principalmente na África e América do Sul devido à diversidade de hospedeiros intermediários e definitivos de *T. gondii* nesses locais (PETERSEN, 2007; AJZEMBERG et al., 2009). Estudos demonstram casos de toxoplasmose ocular e congênita na América do Sul estão relacionados com cepas recombinantes (PETERSEN, 2007; AJZEMBERG et al., 2009).

1.4 Resposta imune a *T. gondii*

A infecção por *T. gondii* desencadeia no hospedeiro resposta dos sistemas imunológicos inato e adaptativo. Como o parasito é intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra o patógeno é mediado pela resposta imune celular. (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; MAUBON et al., 2008).

O parasito é capaz de ativar macrófagos e células NK, que constituem a primeira linha de defesa contra o parasito nos estágios iniciais da infecção. Após a infecção de células hospedeiras por *T. gondii*, há aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-12 (IL-12) e interferon- γ (IFN- γ) por essas células do sistema imune inato (MILLER et al., 2009). Estudos evidenciam que os receptores do tipo *toll like receptors* (TLRs) são importantes durante a resposta imune inata, já que a interação do parasito com esses receptores presentes em células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* (NK) desencadeiam aumento na produção de IL-12 e IFN- γ (MILLER et al., 2009; YAROVISNKY, 2011; SANECKA; FRICKEL, 2012). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias está associada com a ativação da resposta imune adaptativa mediada pelos linfócitos T CD4+ e CD8+, que atuam produzindo e secretando diversos mediadores inflamatórios, como óxido nítrico, e induzindo aumento ainda maior nos níveis de IL-12 e IFN- γ (MILLER et al., 2009; MELO et al., 2011).

O controle de *T. gondii* depende da ação de IL-12, que atua induzindo as células tanto da imunidade inata quanto da adaptativa a produzirem e liberarem IFN- γ , que é o maior mediador da resistência contra o parasito, promovendo vários mecanismos intracelulares para inibir a multiplicação do parasito (MELO et al., 2011; DUPONT et al., 2012). A ligação de IFN- γ , com seu receptor, induz a fosforilação do transdutor de sinais e ativador de transcrição-1 (STAT1), que induz a expressão de vários genes envolvidos com a indução da eliminação de *T. gondii* (MELO et al., 2011). Além disso, IFN- γ está associado com a

indução da conversão de taquizoítas em bradizoítas, induzindo a cronificação da infecção e, também está associado com a prevenção da ruptura dos cistos teciduais impedindo a reagudização da infecção (MILLER et al., 2011).

Outra citocina importante envolvida na eliminação de *T. gondii* é o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que está associado com a indução de apoptose das células infectadas pelo parasito além de aumentar a capacidade microbicida de macrófagos e induzir células NK a produzirem níveis maiores de IFN- γ (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; KÖRNER et al., 2010).

As células efectoras TCD8+ envolvidas na resistência do hospedeiro ao parasito exercem suas funções pela atividade citotóxica e secreção de citocinas pró-inflamatórias que regulam a resposta imune. Os linfócitos TCD8+ são essenciais na resistência durante a fase ativa da infecção e desempenham a principal função efetora contra *T. gondii*, uma vez que exercem atividade citotóxica induzindo a apoptose direta contra taquizoítas ou células infectadas pelo parasito (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; MELO et al., 2011).

Dessa forma, o combate à infecção por *T. gondii* é mediada pela secreção de citocinas e fatores pró-inflamatórios produzidos por células do sistema imune inato e adaptativo no sentido de conter a proliferação do parasito e induzir a eliminação do mesmo. No entanto, *T. gondii* é capaz de induzir mudanças na transcrição gênica do hospedeiro como forma de evasão da resposta imune desencadeada contra o parasito. Assim, o sucesso da infecção ou do combate ao parasito está associado com o balanço entre a resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão utilizados pelas diferentes cepas de *T. gondii* (MILLER et al., 2009; MELO et al., 2011).

1.5 Toxoplasmose

A toxoplasmose é a zoonose causada pelo protozoário *T. gondii*. Essa protozoose, ao contrário de outras doenças causadas por parasitos, não é restrita as regiões tropicais e

subtropicais. Os altos índices de infecção pelo parasito fazem com que a doença seja uma ameaça à saúde humana e animal (SILVA; LANGONI, 2009; JONES; DUBEY, 2012).

A toxoplasmose possui ampla distribuição geográfica e estima-se que aproximadamente 25 – 30% da população mundial apresenta-se infectada por *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No Brasil, pesquisas sorológicas revelam que a prevalência da infecção por *T. gondii* é de 56% (DUBEY et al., 2012). Em algumas áreas brasileiras a prevalência da toxoplasmose chega a 84% (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A prevalência de pessoas infectadas com a doença relaciona-se com diversos fatores que variam de uma região para região (JONES; DUBEY, 2012). Na França, por exemplo, a prevalência de *T. gondii* é alta, cerca de 80% da população e, provavelmente, relaciona-se com o hábito da ingestão de carne mal cozida pelos franceses (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Nos países tropicais a prevalência da infecção também é alta, já que o clima nesses lugares favorece a esporulação e a sobrevivência de oocistos no meio ambiente (JONES; DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

As manifestações clínicas e a severidade da infecção dependem da interação entre o parasito e o hospedeiro e incluem a virulência da cepa, o tamanho do inóculo, a via de infecção, a capacidade de resposta imune (humoral e celular) do hospedeiro, a integridade das mucosas e das barreiras epiteliais, a idade e as características genéticas do hospedeiro (RORMAN et al., 2006; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Em indivíduos imunocompetentes, geralmente a toxoplasmose cursa de forma benigna, mas há dois casos em que a doença é potencialmente grave: em pacientes imunocomprometidos e quando há transmissão congênita da doença (DUBEY et al., 2012).

1.6 Infecção por *T. gondii* durante a gestação: Toxoplasmose Congênita

A transmissão congênita da toxoplasmose ocorre quando a mulher adquire a infecção durante o período gestacional. A toxoplasmose congênita é grave e pode causar sérios danos ao feto infectado (ROBBINS et al., 2011).

Durante a gestação, há diversas alterações no organismo materno que contribuem para o sucesso gestacional (YAP et al., 2006). Uma dessas alterações relaciona-se ao aumento de hormônios, principalmente progesterona e estrógeno. Além disso, no curso da gestação ocorrem alterações no balanço do perfil de citocinas Th1/Th2 (CHEN et al., 2012). Dessa forma, durante o processo gestacional, com exceção da fase de implantação e parto, o perfil de resposta imune na placenta é do tipo 2, caracterizado pela expressão de citocinas regulatórias e/ou anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-10 (LUPPI, 2003; AGRAWAL; HIRSCH, 2012; CHEN et al., 2012). Uma das citocinas de tipo 2 mais importante nesses processos é a IL-10, trabalhos mostram que camundongos deficientes em IL-10 são altamente susceptíveis à infecção, são incapazes de controlá-la e apresentam processo inflamatório intenso no intestino e fígado, provavelmente pela produção sem controle de IL-12, IFN- γ e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (YAP et al., 2006).

Outra citocina importante na infecção por *T. gondii* durante a gestação é o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), em estudo recente do nosso grupo foi possível observar que no primeiro trimestre de gestação, MIF está associado ao controle da infecção enquanto no terceiro trimestre essa citocina está associada com a maior susceptibilidade à infecção nesse período gestacional (GOMES et al., 2011).

Essas alterações são necessárias para que haja tolerância materna aos aloantígenos paternos. No entanto, a polarização da resposta imune durante a gestação para um perfil anti-inflamatório favorece a transmissão placentária de *T. gondii*, já que a resposta imune requerida para o combate do parasito é do tipo pró-inflamatório (MILLER et al., 2009).

Na transmissão congênita da toxoplasmose, o parasito que se encontra na forma taquizoíta, ganha a circulação fetal após haver a infecção da placenta (BOJAR; SZYMANSKA, 2010). Após entrar em contato com o parasito, o feto pode apresentar manifestações clínicas com gravidade diferente dependendo da virulência da cepa de *T. gondii*, da capacidade de resposta imune materna durante a parasitemia e do período gestacional (RORMAN et al., 2006; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Mulheres infectadas cronicamente, quando imunossuprimidas, também podem transmitir o parasito ao feto, resultando na forma congênita da toxoplasmose. Nesse caso, com a supressão do sistema imune há reagudização da doença e posterior infecção placentária e fetal (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

A probabilidade de haver infecção fetal quando a primo infecção materna ocorre no período pré-concepção é de 1%. Quando a mulher adquire a infecção no primeiro e segundo trimestres da gestação, a chance de ocorrer transmissão da doença para o feto é de 20-33% (CARLIER et al., 2011). Enquanto que, no terceiro trimestre gestacional a infecção fetal ocorre com maior frequência, em cerca de 60-90% dos casos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; LINDSEY; DUBEY, 2011). Entretanto, os danos causados aos fetos em consequência da infecção, são mais graves quando a transmissão se dá no primeiro e segundo trimestres da gestação e mais amenos quando a infecção fetal ocorre no terceiro trimestre gestacional (LINDSEY; DUBEY, 2011).

A infecção materna aguda também pode ocasionar a morte ao feto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Além disso, alguns fetos podem apresentar sinais clínicos da toxoplasmose antes do nascimento como calcificações intracraniais, dilatação ventricular e aumento hepático. Já as manifestações clínicas em neonatos podem variar e incluem: hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite, estrabismo, cegueira, retardo psicomotor e mental, trombocitopenia e anemia (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; LINDSAY; DUBEY,

2011). A tríade clássica da toxoplasmose consiste em coriorretinite, calcificação intracranial e hidrocefalia e é observada em menos de 10% dos casos de infecção congênita (RORMAN et al., 2006).

Chama a atenção o fato de que, na maioria dos casos (70 – 90%), os recém-nascidos são assintomáticos para a doença e podem desenvolver lesões na segunda ou terceira décadas de vida, sendo que 80% das crianças que nascem com toxoplasmose congênita desenvolvem problemas de aprendizagem ou visuais na vida adulta (RORMAN et al., 2006; MONTROYA; REMINGTON, 2008).

A incidência da infecção congênita varia entre os países e está associada aos hábitos alimentares, higiênicos e sócio-culturais das mulheres. No mundo, a infecção por *T. gondii* já é considerada o segundo tipo de infecção intrauterina mais frequente (BOJAR; SZYMANSKA, 2010). No Brasil, estima-se que um bebê em cada três mil nascimentos esteja infectado por *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A prevalência de mulheres, em idade gestacional, soro positivas para *T. gondii* é de 15% nos Estados Unidos, 58% na Europa Central, 51-72% na América Latina e de 54-77% em países africanos (RORMAN et al., 2006; ELSHEIKHA, 2008). No Brasil essa prevalência é de 33-92% e é considerada uma das mais altas do mundo (DUBEY et al, 2012).

1.7 Apoptose

Apoptose é um processo de morte celular programada, que ocorre tanto em tecidos adultos como em desenvolvimento (SINAI et al., 2004; STRASSER et al., 2011). Esse processo é importante, pois está associado a diversos eventos celulares, como: remoção de células danificadas ou não desejadas durante o desenvolvimento, remoção de células tumorais, homeostase tecidual, remoção de células durante o processo de envelhecimento de organismos multicelulares, além de ser um importante mecanismo da imunidade inata e

adaptativa contra patógenos. Além disso, a apoptose é essencial para a seleção do repertório linfocitário, garantindo a deleção de linfócitos T e B autoreativos (STRASSER et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012).

O processo apoptótico é caracterizado por alterações típicas que incluem: alteração na simetria da membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, clivagem do DNA, formação de estruturas conhecidas como “blebs”, desintegração celular e formação de corpos apoptóticos (STRASSER et al., 2011).

Células que morrem como resultados de uma doença aguda normalmente incham e sofrem lise, derramando todo o conteúdo intracelular sobre as células vizinhas, um processo chamado de necrose celular e que aciona uma resposta imune potentemente danosa (SINAI et al., 2004). Em contraste, células que sofrem apoptose morrem sem que haja danos às células vizinhas, pois não há ruptura da membrana plasmática e durante o processo há alterações na membrana da célula promovendo o recrutamento de células fagocíticas que removem os corpos apoptóticos sem que haja resposta inflamatória (STRASSER et al., 2011; HAPPO et al., 2012).

O processo apoptótico está associado a uma família de cisteínas proteases, chamadas de caspases, que clivam o substrato no resíduo de ácido aspártico e atuam na execução da apoptose (RUPINDER et al., 2007). As caspases situam-se no citoplasma e são produzidas como pró-enzimas, ou seja, na forma inativa e são ativadas após clivagem proteolítica (ARNOULT, 2006; FAVALORO et al., 2012). As caspases são classificadas em dois grupos: iniciadoras (caspases 8 e 9) e caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7). As iniciadoras têm a função de iniciar o processo apoptótico pela clivagem e ativação de outras caspases, que desempenham papel de efetoras ou executoras, clivando diversos substratos e levando às alterações celulares características da apoptose (FAVALORO et al., 2012; HAPPO et al., 2012).

Nos vertebrados, a apoptose ocorre, principalmente, por duas vias: extrínseca e intrínseca (**Figura 2**). A via extrínseca é iniciada pela interação de receptores de membrana (conhecidos como receptores de morte) com seus ligantes específicos. Os receptores de morte são aqueles que fazem parte da família dos receptores do Fator de Necrose Tumoral, como TNFR e Fas (CD95) (DICKENS et al., 2012). Quando há ligação do receptor ao seu ligante, presente na membrana celular, há formação de um complexo sinalizador de indução de morte (DISC). O DISC incorpora moléculas adaptadoras como FADD (domínio de morte associado ao Fas) que se ligam à pró-caspase iniciadora 8. As caspases iniciadoras clivam e ativam as caspases efetoras dando início ao processo de morte celular (ELMORE, 2007; DICKENS et al., 2012).

A via intrínseca (**Figura 2**), também conhecida como via mitocondrial, é ativada resultando na permeabilização da membrana externa da mitocôndria e promovendo a liberação de proteínas do espaço intermembranoso da mitocôndria. Diversas dessas proteínas iniciam ou regulam a ativação das caspases, a principal delas é o citocromo c (OW et al., 2008; FAVALORO et al., 2012). No citoplasma, o citocromo c se liga ao fator ativador de protease apoptótica - 1 (Apaf-1). O Apaf-1 é um monômero que quando ligado ao citocromo c, na presença de ATP, sofre mudanças conformacionais, formando um heptâmero. Há, então, a exposição de domínios de recrutamento de caspase ativada (CARD), permitindo a ligação da pró-caspase 9, formando o apoptossomo. Este consiste de uma plataforma que promove a ativação da caspase 9 que, posteriormente, ativa as caspases executoras (OW et al., 2008; FAVALORO et al., 2012).

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

Uma vez iniciado o processo de apoptose, a célula passa por diversas transformações que vão culminar nas alterações morfológicas características do processo. A primeira delas é a proteólise das proteínas que atuam na adesão intercelular, causando a retração da célula, em seguida há a proteólise dos elementos do citoesqueleto da célula, como microtúbulos, tubulina e citoqueratina. As caspases efetoras também atuam promovendo a fragmentação do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e lâmina nuclear, que dá início a fragmentação do núcleo da célula. Além disso, as caspases efetoras clivam ICAD (inibidor de DNase ativada por caspase), formando CAD (DNase ativada por caspase) que, por sua vez, atua catalisando a clivagem do DNA, um dos eventos finais da apoptose. Todas essas alterações levam a formação dos “blebs” e, em seguida, dos corpos apoptóticos (TAYLOR et al., 2008; STRASSER et al., 2011). Durante o processo de apoptose há a exposição, na membrana plasmática, do fosfolípido fosfatidilserina (PS). PS fica confinada na região interna da membrana plasmática, mas é translocada para a região externa após os estímulos pró-apoptóticos, induzindo a fagocitose dos corpos apoptóticos (TAYLOR et al., 2008).

1.7.1 Apoptose em células trofoblásticas

As células trofoblásticas apresentam intensa capacidade de diferenciação e proliferação, o trofoblasto apresenta diversas funções durante a gestação, como: adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (ENTRICAN, 2000).

A apoptose é crucial para o desenvolvimento e homeostase de tecidos humanos, incluindo a placenta (CROCKER et al., 2003; FUJITA et al., 2011). O processo apoptótico está presente nas células trofoblásticas e tem como objetivo a renovação dessas células e indução da tolerância aos antígenos fetais durante a gestação (RANGO, 2008). Esse processo

é regulado ao longo do desenvolvimento placentário, sendo que, no terceiro trimestre gestacional a incidência de apoptose é maior do que no primeiro (LEVY; NELSON, 2000; SHARP et al., 2010). Além disso, a apoptose nas células trofoblásticas está associada à proteção imunológica. Fas ligante (FasL) induz apoptose em células T que expressam receptor em suas membranas conhecido como Fas ou CD95 (VELJKOVIC-VUJSKLIIJA et al., 2012). O sistema Fas-FasL, que atua na regulação das funções imunes induzindo morte celular mediada por linfócitos T, é expresso nos tecidos reprodutivos e, alterações na sua expressão e função, podem levar a anormalidades como o desenvolvimento de vários cânceres ginecológicos (SHARP et al., 2010). A interação Fas-FasL contribui para que a placenta seja uma região imunologicamente privilegiada (LEVY; NELSON, 2000; VELJKOVIC; VUJSKLIIJA et al., 2012).

Estudos demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , aumentam a expressão de Fas/FasL nas células trofoblásticas. Enquanto, citocinas anti-inflamatórias como interleucina-10 (IL-10) e interleucina-6 (IL-6) diminuem a expressão de Fas/FasL e ativam proteínas que inibem a apoptose (ASCHKENAZI et al., 2002). As células trofoblásticas também apresentam inibidores de apoptose, como proteínas da família Bcl-2 e proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (HUPPERTZ et al., 2006; LI et al., 2012).

O controle dos processos apoptóticos nas células trofoblásticas é extremamente importante e garante o sucesso da gestação. Além disso, o controle da apoptose durante o desenvolvimento embrionário normal é importante como forma de deleção de diversas proteínas associadas à letalidade e mal desenvolvimento fetal (HAEZELL; CROCKER, 2008). Estudos demonstraram que tanto o excesso quanto a deficiência da apoptose na placenta, está associada aos abortos e complicações durante a gestação (LI et al., 2012).

1.7.2 Apoptose e infecção por *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii altera o programa apoptótico da célula hospedeira, promovendo ou inibindo a apoptose. Essa dupla atividade do parasito está associada com a interação do mesmo a sinais pró e anti-apoptóticos da célula hospedeira (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). O parasito promove apoptose de algumas células para modular a resposta imune do hospedeiro. Com o aumento na expressão de Fas/FasL, leucócitos são induzidos a entrar em apoptose. A apoptose exagerada dos leucócitos resulta em inabilidade do sistema imune do hospedeiro em controlar a infecção, causando intenso processo inflamatório que pode levar a um quadro fatal de toxoplasmose (LANG et al., 2007; LÜDER; GROSS, 2005). Estudos recentes demonstraram que proteínas dos grânulos densos de *T. gondii* são capazes de induzir apoptose em monócitos, e essa indução é dependente da via de sinalização do fator de crescimento- β (TGF- β) (D'ANGELILLO et al., 2011).

Entretanto, o sucesso da infecção por *T. gondii* depende da capacidade do parasito de se evadir dos mecanismos de imunidade do hospedeiro e por ser um parasito intracelular obrigatório, *T. gondii* é bem adaptado para a sobrevivência no meio intracelular (SANTOS et al., 2010). Essa adaptação está associada com a capacidade que o parasito desenvolveu de diminuir a morte celular do hospedeiro (LÜDER et al., 2009). A resistência a apoptose mediada pelo parasito já foi observada mesmo após o tratamento com diversos indutores de apoptose, incluindo citotoxicidade mediada por linfócitos, radiação, adição de fatores de crescimento, tratamento com TNF- α e outros agentes tóxicos (SINAI et al., 2004; LÜDER; GROSS, 2005). *T. gondii* também é capaz de diminuir a apoptose em cultura de células primárias após a adição de fatores de crescimento (LÜDER; GROSS, 2005). Além disso, nosso grupo demonstrou que a interferência de *T. gondii* na incidência de apoptose da célula hospedeira está relacionada ao tipo de cepa do parasito. Células trofoblásticas BeWo

infectadas com cepa altamente virulenta (RH) apresentam índices de apoptose menores do que a moderadamente virulenta (ME49), (ANGELONI et al., 2009).

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

A inibição das vias intrínseca e extrínseca da apoptose por *T. gondii* parece ser dependente da ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B). Essa ativação resulta em uma super-regulação da transcrição de genes anti-apoptóticos, e depende tanto da enzima I kappa Kinase (IkK) do hospedeiro quanto da atividade da enzima do parasito (TgIkK). Essas enzimas atuam fosforilando o inibidor de NF- κ B (IkB α), após essa fosforilação há translocação do NF- κ B, que situa-se no citoplasma quando inativo, para o núcleo da célula (KIM et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012).

A ativação da via de sinalização fosfoinositol 3-kinase (PI3K) também inibe a apoptose. Essa inibição ocorre através da ligação de fatores de crescimento ao receptor PI3K, ativando-o. Há então a fosforilação de fosfatidil-inositol bifosfatado (PIP2), formando PIP3, que recruta a proteína kinase B PKB/AKT e kinase 1 dependente de fosfoinositol (PDK1) para a membrana celular. PDK1 ativa PKB/AKT (CARMEN; SINAI, 2007). Em condições normais, essa via promove a fosforilação de membros da família Bcl-2 como Bad, Bax e Bim, induzindo sua degradação citoplasmática e conferindo sinais de sobrevivência para a célula (RODRIGUES et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que nos estágios iniciais da infecção por *T. gondii*, as células infectadas apresentam altos níveis de AKT/PKB, sugerindo que, no início da infecção, a ativação de PI3K é responsável pela prevenção da apoptose (KIM; DENKERS, 2006; QUAN et al., 2013).

O parasito também inibe apoptose da célula hospedeira interferindo na liberação do citocromo c, alterando o balanço de proteínas pró e anti-apoptóticas (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; PENG et al., 2011). Estudos demonstraram que o parasito é capaz de induzir aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas e diminuir os níveis de pró-apoptóticas (LÜDER et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012). Outros eventos também estão associados ao bloqueio da apoptose, como a diminuição da ativação da proteína kinase c-Jun amino-terminal (JNK) que ativa a proteína kinase ativada por mitógenos (MAPK) responsável pela transmissão de estímulos apoptogênicos até a mitocôndria, levando a liberação do citocromo c (CARMEN et al., 2008). Além disso, Hwang e colaboradores (2010) demonstraram que o parasito é capaz de inibir a apoptose das células hospedeiras promovendo aumento na expressão de proteínas da família Bcl-2 e de choque térmico HSP70, essas atuam bloqueando a apoptose das células infectadas.

Estudos recentes demonstraram que *T. gondii* também é capaz de inibir a apoptose de células hospedeiras interferindo em vias de indução de apoptose independentes de caspases. Yamada e colaboradores (2011) verificaram que o parasito atua bloqueando a via da granzima B, inibindo a ação enzimática dessa granzima e, conseqüentemente, inibe a apoptose de células hospedeiras.

Dessa forma, o bloqueio da apoptose garante ao parasito a obtenção dos metabólitos e a sobrevivência no interior da célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012). No entanto, a desregulação do processo apoptótico de algumas populações celulares, durante a infecção por *T. gondii*, pode resultar em processo infeccioso acentuado e até na morte do hospedeiro (LANG et al., 2007).

1.8 Células de Coriocarcinoma Humano (Linhagem BeWo)

A linhagem de células BeWo é derivada de coriocarcinoma humano e foi isolada em 1968 por Pattillo e Gey (PATTILLO et al., 1979). Essas células formam monocamadas que não se diferenciam em sinciciotrofoblasto, oferecendo uma alternativa no sistema de cultura para os mais variados estudos *in vitro* (CHURCH; APLIN, 1998).

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

Essa linhagem de células é particularmente atrativa para experimentos *in vitro*, pois é estável, relativamente de fácil manutenção e o crescimento em monocamadas ocorre em curto período (4 a 5 dias). Somando-se a isto, células BeWo apresentam propriedades morfológicas e marcadores bioquímicos comuns ao trofoblasto normal (VAN DER ENDE et al., 1990). Apesar de se encontrarem em cultura há mais de 40 anos, essa linhagem celular mantém a habilidade de secretar grandes quantidades de gonadotrofina coriônica humana (HCG) e hormônio lactogênio placentário, substâncias secretadas pela placenta humana (PATTILLO et al., 1979). Além disso, células BeWo, como as outras células trofoblásticas, expressam funcionalmente Fas/FasL, o que provavelmente contribui com mecanismos de evasão de ações do sistema imune pela da regulação negativa do receptor Fas, matando linfócitos por meio da expressão do FasL (CHEN et al., 2011).

Trabalhos do nosso grupo com essa linhagem celular demonstraram que as células BeWo são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, mesmo após a administração exógena de IFN- γ (Oliveira et al., 2006). Além disso, quando há bloqueio de IL-10 ou de TGF- β , células BeWo são capazes de controlar a infecção por *T. gondii*, apenas na presença de IFN- γ , demonstrando que a susceptibilidade dessas células ao parasito ocorre devido à mecanismos imunomoduladores dependente da ação coordenada de citocinas (Barbosa et al., 2008).

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

2. Justificativa

O controle dos processos apoptóticos nas células trofoblásticas é extremamente importante e garante o sucesso da gestação. Estudos demonstraram que o excesso de apoptose de células trofoblásticas associa-se a inúmeras complicações gestacionais como abortos, pré-eclampsia e restrição de crescimento intrauterino. Dados obtidos pelo nosso grupo demonstram que *T. gondii* é capaz de alterar o programa apoptótico da células trofoblásticas, promovendo ou inibindo a apoptose. Essa dupla atividade do parasito está associada com a interação do mesmo aos sinais pró e anti-apoptóticos da célula hospedeira. *T. gondii* desenvolveu diversas estratégias para modular a apoptose da célula hospedeira, interferindo na cascata de ativação das caspases e no aumento da expressão, induzida pelo parasito, de moléculas anti- ou pró-apoptóticas das células infectadas. A inibição ou indução da apoptose na célula hospedeira estão relacionadas com o tipo de cepa e os fatores de virulência dessas cepas de *T. gondii*. Assim, a execução do presente trabalho adicionou dados para um melhor entendimento do papel modulador das diferentes cepas de *T. gondii* nas vias de apoptose de células trofoblásticas (linhagem BeWo), uma vez que as alterações dos processos apoptóticos no ambiente placentário, durante a infecção por *T. gondii*, podem resultar em processo infeccioso acentuado, bem como induzir a morte fetal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar incidência de apoptose em células trofoblásticas BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* e submetidas ao tratamento com citocinas pró ou anti-inflamatórias. Também serão analisadas proteínas envolvidas nas cascatas de sinalização intracelular e responsáveis pelo controle dos processos de morte celular.

3.2 Objetivos Específicos

- Dosar as citocinas MIF, TNF- α , IL-12, IL-6, IL-17, IL-10 e TGF- β 1 em sobrenadantes de culturas de células trofoblásticas BeWo, infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*.
- Analisar a incidência de apoptose em células trofoblásticas BeWo infectadas com a cepa RH ou ME49 de *T. gondii* e tratadas com as citocinas MIF, INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β 1.
- Analisar a expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células trofoblásticas BeWo infectadas com a cepa RH ou ME49 de *T. gondii* e tratadas com as citocinas MIF, INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β 1.
- Verificar a existência de associação entre a incidência de apoptose e a expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células trofoblásticas BeWo infectadas com a cepa RH ou ME49 de *T. gondii* e tratadas com as citocinas MIF, INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β 1.
- Detectar a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e proteína da família das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) survivina, em células trofoblásticas BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células trofoblásticas BeWo

Células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, USA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), 10.000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

O repique das células foi realizado a cada dois dias. Inicialmente as células foram lavadas com meio sem soro e em seguida incubadas com solução de tripsina mais 0,25% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma) durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após este procedimento, as células foram lavadas e retiradas dos frascos de cultura com uso de meio a 10% de soro, transferidas para tubos de 15ml e centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1ml de meio com soro e distribuídas em frascos novos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento: 90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma).

4.2 Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii*

4.2.1 Manutenção *in vivo*

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

Parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, através de passagens seriadas a intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 10^6 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO et al., 1980).

4.2.2 Manutenção *in vitro*

Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfato a 0,01 M (PBS, pH 7,2) estéril e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação (1500rpm, 5 minutos) para remoção dos debris celulares. Em seguida, o “pellet” foi ressuspenso em 0,5ml de meio RPMI-1640 e adicionado em frascos contendo células BeWo, com a finalidade de manter *in vitro* células infectadas por *T. gondii*.

A medida que a maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi passado para um tubo de 15ml, centrifugado a 1500rpm por cinco minutos em temperatura ambiente e o “pellet” foi ressuspenso em 1ml de meio RPMI e distribuído em dois frascos contendo células não infectadas.

4.3 Manutenção da cepa ME49 de *T. gondii*

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

Quando as células encontravam-se lisadas pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15ml, centrifugado a 500rpm, por um minuto em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo apenas taquizoítas ressuspenso

em 0,5ml e distribuído em frascos contendo células da linhagem BeWo para manutenção da cepa nessa linhagem celular.

A medida que a maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi passado para um tubo de 15ml, centrifugado a 1500rpm por cinco minutos em temperatura ambiente e o “pellet” foi ressuspenso em 1ml de meio RPMI e distribuído em dois frascos contendo células não infectadas.

4.4 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*

Células BeWo foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^6 células/200µl) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* na proporção de 5 parasitos por célula (5:1), por 2 e 24 horas. Como controle, as células não foram infectadas e 24 horas após o plaqueamento das células o meio foi trocado. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA Captura ou Citometria de Fluxo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.4.1 Dosagem das citocinas MIF, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β 1, por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de captura

As concentrações de MIF, IL-10 e TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e de IL-12 e TNF- α (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), nos sobrenadantes de células BeWo foram mensuradas por ELISA Captura, de acordo com as instruções dos fabricantes. Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (BD Biosciences) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-humanos específicos para cada citocina por 12 horas a temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas com PBS-T (0,05%) e bloqueadas durante 1

hora a temperatura ambiente com PBS mais 1% de soro albumina bovina (BSA) para as citocinas IL-10 e MIF ou PBS-T (5%) mais 0,05% de azida sódica para TGF- β 1 ou PBS mais 10% de SBF para TNF- α e IL-12. Após novas lavagens em PBS-T, 50 μ l das curvas de cada citocina (de 4000pg/ml a 62,5pg/ml para IL-10 e MIF; de 2000pg/ml a 31,25pg/ml para TGF- β 1; e de 500pg/ml a 7,8 pg/ml para TNF- α e IL-12) ou 50 μ l das amostras de sobrenadantes de células BeWo foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, as placas para detecção de MIF, IL-10 e TGF- β foram incubadas com anticorpos de detecção anti-citocinas humanas conjugados com biotina durante 2 horas a temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada às placas e permaneceu em incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Já as placas para detecção de TNF- α e IL-12 foram incubadas com o anticorpo de detecção anti-citocinas humanas conjugados com biotina e estreptavidina conjugada com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA).

No ensaio de detecção para TGF- β 1, os sobrenadantes foram primeiramente tratados com soluções de ácido e base para ativar a citocina presente na amostra, uma vez que TGF- β é secretado pelas células como um complexo inativo. O tratamento procedeu-se da seguinte forma: 10 μ l de HCl 1M foi misturado aos 50 μ l de sobrenadante e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 10 μ l de solução contendo 1,2 M de NaOH e 0,5M de Hepes foi adicionada aos sobrenadantes previamente incubados com HCl para neutralizar a ação do ácido e, em seguida, as amostras foram colocadas nas placas de ELISA.

4.4.2 Dosagem das citocinas IL-6 e IL17A por citometria de fluxo

As citocinas humanas IL-6 e IL-17A nos sobrenadantes de células BeWo foram mensuradas usando o kit Th1/Th2/Th17 “Cytometric Bead ArrayTM” (CBA) (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras de sobrenadantes foram misturadas com uma mistura de “beads” de captura para cada citocina a ser quantificada. Após a mistura, foram adicionados os anticorpos anti-humanos conjugados com ficoeritrina (PE) para IL-6 e IL-17A por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os tubos foram então centrifugados (1300rpm por 7 minutos) e os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e descartados. O “pellet” contendo as “beads” foi homogeneizado e analisado por citometria de fluxo. As amostras foram lidas no citômetro FACSCalibur BDTM (BD Company, San Diego, CA, EUA) e os dados foram analisados pelo software BDTM Cell Quest e CBA software. Os resultados foram apresentados em pg/ml de acordo com a referência das curvas padrões de cada citocina. Os limites de detecção de cada citocina foram: 20,16pg/ml para IL-6 e 19,1pg/ml para IL-17A.

4.5 Análise de incidência de apoptose em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*

Células BeWo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan (Sigma). Após o ajuste para uma concentração de 5×10^4 células/200µl, as mesmas foram transferidas para uma placa de 24 poços (Caltech, Uberlândia, MG, Brasil) e cultivadas em lamínulas de 13mm, por 24 horas em meio RPMI a 10% de soro e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e pré-tratadas com as formas recombinantes de MIF (eBioscience, San Diego, CA, USA), TNF-α (Millipore, São Paulo, SP, Brasil), IFN-γ (Invitrogen Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA), IL-6 (PeproTech, Ribeirão Preto, SP, Brasil), TGF- β 1 (R&D Systems) ou IL-10 (R&D Systems), em uma concentração de 15ng/ml. Após 24 horas em estufa, as células foram infectadas ou não pelas cepas RH ou ME49 de *T. gondii* (5:1) e incubadas durante 3 horas. Em seguida, os parasitos não aderentes removidos por lavagem dos poços com meio de cultura, e as células foram novamente tratadas com rMIF, rTNF- α , rIFN- γ , rIL-6, rIL10 ou rTGF- β 1, nas mesmas concentrações por 2 e 24 horas. Paralelamente, células BeWo foram tratadas com as citocinas, mas não infectadas; ou foram apenas infectadas e não tratadas com citocinas. Como controle, as células não foram tratadas com citocinas e nem infectadas. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

As células nas lamínulas foram lavadas em salina tamponada com Tris (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) (TBS, pH 7,4), fixadas em formol a 10% em TBS por 24 horas e submetidas a imuno-histoquímica para detecção de células apoptóticas utilizando o anticorpo M30.

4.5.1 Imuno-histoquímica para detecção de apoptose utilizando o anticorpo M30

Após a fixação, as células foram incubadas por oito minutos em solução de ácido acético a 5% para bloqueio da fosfatase endógena, em seguida foram lavadas três vezes, em solução salina tamponada com TRIS 0,05 M, pH 7, 4, acrescida de 2,5 % de cloreto de Sódio (TBS) por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lamínulas foram incubadas com soro normal de cabra a 2,5% em TBS por 45 minutos a 37°C; após este bloqueio, foi feita a incubação das células com anticorpo monoclonal de camundongo anti novo epítipo de citoqueratina 18 (clone M30, CytoDEATH, Roche Applied Science, USA), na diluição de 1:250, em TBS por 12 horas a 4° C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lamínulas foram incubadas com IgG de cabra anti - IgG de camundongo biotinizada (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) na diluição de 1:600 em TBS por uma hora a 37° C. Após sucessivas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo

avidina/biotina (ABC) - fosfatase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:100 em TBS, a 37° C por 30 minutos. Após novas lavagens em TBS, houve a revelação da enzima fosfatase alcalina com fast red – naftol (Sigma), em tampão TRIS, lavagens em TBS e água corrente e contra - coloração com hematoxilina de Meyer, por 8 minutos à temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lamínulas foram montadas em lâminas em glicerina.

4.5.2 Análise de incidência de apoptose

As células em apoptose foram quantificadas quanto a porcentagem de células imunomarcadas a cada 100 células examinadas e, assim, definiu-se o índice de apoptose em cada condição analisada.

4.6 Análise da expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*

Células BeWo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan (Sigma). Após o ajuste para uma concentração de 1×10^6 células/2000 μ l, as mesmas foram transferidas para uma placa de 6 poços (Caltech) e cultivadas por 24 horas em meio RPMI a 10% de soro e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com citocinas e infectadas como descrito no item 4.5. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicatas.

4.6.1 Citometria de fluxo para análise da expressão de Fas/CD95

Posteriormente, as células foram removidas com gelo das placas de 6 poços, ressuspensas em PBS estéril e centrifugadas a 1300rpm, a 4°C, por 7 minutos. Em seguida as células foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 5×10^5 células/100 μ l em PBS com 0,5% de BSA (Sigma), a suspensão celular foi então transferida

para tubos de poliestireno de 15x75mm (BD Biosciences). Em seguida as células foram incubadas com 5µl (em cada tubo) do anticorpo monoclonal anti-CD95 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), por 30 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Paralelamente células foram incubadas com isotipo controle, IgG de camundongo irrelevante (R&D Systems), como controle da reação. Após esse período, foi adicionado 1 ml de PBS com 0,5% de BSA (Sigma) em cada tubo e os mesmos foram centrifugados por a 1300rpm, por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 300µl de fixador contendo paraformaldeído e cacodilato de sódio. Em seguida foi realizada a leitura de 20.000 eventos, para cada condição experimental, no citômetro FACSCalibur BD™ (BD Company, San Diego, CA, EUA).

4.7 Detecção de proteínas de sinalização intracelular em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*

Células BeWo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Newbauer. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan (Sigma). Após o ajuste para uma concentração de 1×10^6 células/2000µl, as mesmas foram transferidas para uma placa de 6 poços (Caltech) e cultivadas por 24 horas em meio RPMI a 10% de soro e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células foram infectadas como descrito no item 4.4. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicatas.

As células foram coletadas, centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, homogeneizadas e lisadas em tampão de lise gelado contendo 50mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM de EDTA; 0,5% de Triton X100; 10% de glicerol; 1mM de dithiothreitol (DTT), 200mM de NaCl e suplementado com coquetel de inibidores de proteases (Complete®, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha) mais 1mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) e 1mM de fluoreto de

sódio (NaF) (ambos Sigma). Os lisados foram centrifugados a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C, os sobrenadantes contendo proteínas totais foram coletados e submetidos à dosagem proteica pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.7.1 Western blotting para detecção das proteínas ERK1/2 fosforilada e survivina (IAP)

Após o ajuste para 30µg de proteínas, as amostras de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) sobre condições desnaturantes e transferidas para membranas de PVDF (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas contendo as proteínas totais foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação constante em tampão de blotting (25mM de Tris; 0,15M de NaCl e 0,1% de Tween 20, pH 7,4) contendo 4% de leite em pó (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil). Após este período, as membranas foram incubadas por 12 horas a temperatura ambiente e sob agitação com os seguintes anticorpos primários: policlonal de coelho anti-ERK1/2 fosforilada humana (Santa Cruz Biotechnology), policlonal de camundongo anti-survivina (IAP) humana (Santa Cruz Biotechnology) ou anticorpo monoclonal de camundongo anti-β-actina humana (Santa Cruz Biotechnology), todos na concentração de 1:1000, diluídos em tampão de blotting com 2% de leite em pó. Depois, as membranas foram lavadas em tampão de blotting e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (anti-coelho-peroxidase ou anti-camundongo-peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories) na concentração de 1:3000 em tampão de blotting também a 2% de leite em pó durante 2 horas sob agitação e temperatura ambiente. A reação foi revelada em câmara escura usando kit de quimioluminescência (ECL kit, GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil) e as quantidades iguais de proteínas foram confirmadas por coloração de Ponceau (1%). A densitometria foi realizada usando o programa “KODAK software” (1D Image Analysis Software 3.5) com a finalidade de determinar a intensidade média das bandas. Os dados foram demonstrados como

densidade relativa da razão entre as intensidades médias das bandas de ERK1/2, survivina (IAP) e β -actina.

4.8 Análise estatística

Todos os dados foram analisados como média e erro padrão da média de dois ou três experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, quando apropriado, usando o programa GraphPad Prisma versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1 A produção de citocinas por células BeWo é diferentemente modulada após a infecção com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*.

Para verificar a influência das cepas RH ou ME49 de *T. gondii* na produção de citocinas por células BeWo, realizou-se a dosagem de citocinas por ELISA e CBA em sobrenadantes de cultura de células BeWo não infectadas e infectadas pelas cepas (Figura 1).

Após o período de 2 horas de infecção, foi observado nos sobrenadantes das células BeWo infectadas com a cepa ME49 maior produção de MIF, TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-17A quando comparado com células não infectadas (controles) (Figuras 1A, B, C, D, E). Já a produção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 foi menor em células infectadas com a cepa ME49 em relação aos controles (Figuras 1F, G). As células, quando infectadas com a cepa RH apresentaram maior secreção de MIF, TGF- β 1 e IL-10 do que o controle (Figuras 1A, F, G). Após 24 horas de infecção, células infectadas com a cepa ME49 apresentaram aumento na produção de MIF, TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-17A do que as células não infectadas (Figuras 1A, B, C, D, E). De forma oposta, a produção de IL-10 foi menor do que a observada no controle (Figura 1F). A análise das células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii* demonstrou maior produção de MIF, IL-17A, IL-10 e TGF- β 1 do que as células não infectadas (Figuras 1A, E, F, G), enquanto a produção de IL-6 foi menor do que a observada no controle (Figura 1D).

Nos dois tempos de infecção analisados, células BeWo infectadas com a cepa ME49 demonstraram perfil de secreção de citocinas oposto ao observado pela cepa RH (Figura 1). Células infectadas com a cepa ME49 exibiram um perfil de secreção predominantemente pró-inflamatório, uma vez que as células infectadas por essa cepa demonstraram maior produção de citocinas como MIF, TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-17A do que as células infectadas com a cepa RH do parasito (Figuras 1 A, B, C, D, E). Além disso, células infectadas com a cepa RH

apresentaram maior produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β 1 e IL-10 do que as células infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* (Figuras 1F, G).

5.2 Células BeWo infectadas com a cepa de *T. gondii* de alta virulência RH apresentam menores índices de apoptose, mesmo na presença das citocinas MIF, TNF- α e IFN- γ

Para analisar o índice de apoptose em células BeWo realizou-se imuno-histoquímica utilizando o anticorpo M30. O processo de apoptose foi observado tanto nas células não infectadas quanto nas infectadas com as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (Figura 2). Células BeWo infectadas com a cepa RH apresentaram um índice de apoptose menor do que o observado em células não infectadas, já com a cepa ME49 o índice de apoptose foi maior do que das células não infectadas. Além disso, o índice de apoptose observado em células infectadas com a cepa ME49 foi maior do que o observado em células infectadas com a cepa RH, nos dois tempos de infecção analisados (Figuras 3 e 4).

Para analisar a influência das citocinas no índice de apoptose de células BeWo após a infecção por *T. gondii*, as células foram previamente tratadas por 24 horas com citocinas, infectadas com as cepas RH ou ME49 por 3 horas e, em seguida, foram novamente tratadas com as mesmas citocinas por 2 e 24 horas. Após esses períodos as células foram analisadas quanto ao índice de apoptose por imuno-histoquímica (Figuras 3 e 4).

Em células tratadas com MIF (Figura 3A), após os períodos de 2 e 24 horas, observou-se que esse tratamento não foi capaz de alterar os índices de apoptose de células BeWo em relação aos controles. Além disso, após 2 horas de incubação, observou-se que o índice de apoptose das células BeWo, infectadas pela cepa RH e tratadas com MIF, foi maior do que o observado em células infectadas e não tratadas. Após 24 horas, o índice também foi maior do nessas células, no entanto, esse índice foi menor do que o observado em células tratadas e não infectadas (Figura 3A). Em células infectadas pela cepa ME49 e tratadas com MIF

apresentaram índice de apoptose maior do que o observado nos respectivos controles, nos dois tempos analisados (Figura 3A).

O tratamento com TNF- α , por 2 e 24 horas, induziu aumento no índice de apoptose de células infectadas com a cepa RH quando comparado com células infectadas e não tratadas; entretanto o índice de apoptose foi menor em células infectadas e tratadas quando comparado com o controle apenas tratado (Figura 3A).

Células BeWo infectadas com a cepa ME49 e tratadas com TNF- α apresentaram índice de apoptose maior do que o observado nos respectivos controles. (Figura 3B).

Após o tratamento com IFN- γ observou-se que células infectadas com a cepa RH apresentaram índice de apoptose menor do que o observado em células tratadas e não infectadas, após os dois períodos de incubação analisados (Figura 3C). Além disso, após 24 horas de tratamento, o índice de apoptose de células infectadas com a cepa RH e tratadas com IFN- γ foi maior do que o índice de apoptose de células infectadas e não tratadas. No entanto esse índice foi menor do o observado em células não infectadas e tratadas (Figura 3C). Em células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com IFN- γ apresentaram maior índice de apoptose do que o observado nos respectivos controles, após 2 e 24 horas de incubação (Figura 3C).

Independente da citocina utilizada para os tratamentos e o tempo de incubação analisados, o índice de apoptose foi sempre maior em células BeWo infectadas com a cepa ME49 do que o observado em células infectadas com a cepa RH (Figura 3). Esses resultados indicam que o índice de apoptose em células BeWo está relacionado com a citocina e com a cepa de *T. gondii*.

5.3 Células BeWo infectadas com a cepa de *T. gondii* de moderada virulência ME49 apresentam menores índices de apoptose após o tratamento com IL-6, TGF- β 1 e IL-10.

Células tratadas com a citocina IL-6 nos dois tempos de análise apresentaram menores índices de apoptose quando comparado com os respectivos controles (Figura 4). Em células infectadas pela cepa RH de *T. gondii*, não foram observadas diferenças estatísticas entre células infectadas e tratadas, entre células infectadas e não tratadas ou entre células não infectadas, mas submetidas ao tratamento com IL-6, após 2 e 24 horas de incubação (Figura 4A). Resultados similares foram observados após a infecção das células BeWo pela cepa ME49 de *T. gondii*. O índice de apoptose em células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com IL-6 foi menor quando comparado com células infectadas e não tratadas, nos dois tempos de incubação analisados. Além disso, após 24 horas de incubação o índice de apoptose foi maior em células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com IL-6 quando comparado com células não infectadas e tratadas (Figura 4A).

Células BeWo tratadas com TGF- β 1 e infectadas com a cepa RH apresentaram índice de apoptose menor do que as células não infectadas e tratadas com a citocina, após 2 e 24 horas de incubação. Não foram observadas diferenças estatísticas entre células infectadas com a cepa RH e tratadas com TGF- β 1 e células não tratadas e infectadas. Além disso, células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com TGF- β 1 apresentaram índice de apoptose menor do que as células infectadas e não tratadas, nos dois tempos de incubação analisados. Não foram observadas diferenças estatísticas em células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com TGF- β 1 em relação com células não infectadas e tratadas com a mesma citocina (Figura 4B).

O tratamento com IL-10 induziu um menor índice de apoptose em células infectadas com a cepa RH quando comparado com as células infectadas e não tratadas, no tempo de 2 horas de incubação (Figura 4C). O tratamento com IL-10 também induziu diminuição nos

índices de apoptose de células tratadas e infectadas com a cepa ME49 quando comparado com as células infectadas e não tratadas (Figura 4C) Também não foram observadas diferenças estatísticas entre células infectadas com a cepa ME49 e tratadas em relação às células não infectadas e tratadas com IL-10 (Figura 4C).

Dessa forma, foi possível observar que os tratamentos com as citocinas IL-6, IL-10 e TGF- β 1 atuam em células trofoblásticas BeWo diminuindo o índice de apoptose mesmo após a infecção com a cepa ME49.

5.4 A expressão do receptor de morte Fas/CD95 é maior em células BeWo infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii*.

Para verificar se as diferenças no índice de apoptose observadas entre as células infectadas e não infectadas e entre as duas cepas de *T. gondii* relacionam-se com a expressão do receptor de morte Fas/CD95, realizou-se citometria de fluxo para detecção deste receptor (Figuras 5 e 6). Células BeWo foram plaqueadas e, após 24 horas, o meio de cultura das células foi trocado sendo adicionado novo meio por mais 24 horas. Após esse período, as células foram infectadas com as cepas RH ou ME49, por 3 horas e, em seguida, lavadas e incubadas com meio de cultura por 2 e 24 horas (Figuras 5 e 6). Além disso, para determinar se o tratamento com diferentes citocinas está associado com a expressão de Fas/CD95, células BeWo foram tratadas com MIF, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 por 24 horas e, infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* por 3 horas e, novamente tratadas com as mesmas citocinas, por 2 e 24 horas (Figuras 5B e 6B).

Após 2 horas de incubação (Figura 5B), foi possível observar aumento na expressão do receptor Fas/CD95 em células infectadas com a cepa ME49 quando comparado com as células não infectadas ou infectadas com a cepa RH. Células tratadas com MIF apresentaram aumento na expressão de Fas/CD95 em células infectadas com as cepas RH ou ME49, quando

comparado com células tratadas, mas não infectadas. Além disso, a expressão do receptor de morte foi maior em células infectadas pela cepa RH e tratadas com MIF do que o observado em células infectadas e não tratadas com a citocina (Figura 5B). Em relação às células tratadas com IFN- γ , por 2 horas, observou-se que o tratamento com a citocina induziu diminuição na expressão do receptor em comparação com células não tratadas. No entanto, a citocina induziu aumento na expressão de Fas/CD95 em células infectadas com as cepas RH ou ME49 quando comparado com os respectivos controles infectados e não tratados. Além disso, a expressão do receptor foi maior nas células tratadas e infectadas com a cepa ME49 do que nas células tratadas e infectadas com a cepa RH do parasito (Figura 5B). Células tratadas com TNF- α por 2 horas, apresentaram maior expressão do receptor de morte quando as mesmas estavam infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*. Esse aumento foi observado quando essas células foram comparadas com as células tratadas mas não infectadas e com as células infectadas mas não tratadas (Figura 5B).

Após o período de 24 horas, observou-se aumento na expressão do receptor de morte nas células infectadas com as cepas RH ou ME49 em relação às células não infectadas (Figura 6B). Após o tratamento com MIF, por 24 horas, observou-se aumento na expressão de Fas/CD95 em células tratadas e não infectadas ou em células infectadas com a cepa ME49 quando comparados com os respectivos controles (Figura 6B). Já o tratamento com IFN- γ , por 24 horas induziu aumento na expressão do receptor Fas/CD95 tanto nas células não infectadas quanto nas infectadas pelas cepas RH ou ME49 em comparação com os respectivos controles não tratados (Figura 6B). Em relação ao tratamento com TNF- α , observou-se aumento na expressão do receptor de morte nas células tratadas e infectadas com as cepas RH ou ME49 em relação às células tratadas e não infectadas, no período de 24 horas (Figura 6B).

O tratamento com IL-6, nos dois períodos analisado (Figuras 5B e 6B) induziu diminuição na expressão do receptor Fas/CD95 em todas as condições analisadas quando comparadas com os respectivos controles, ou seja, com as células não tratadas com a citocina.

Em células tratadas com IL-10, por 2 horas, (Figura 5B) observou-se diminuição na expressão do receptor de morte nas três condições analisadas quando comparadas com os respectivos controles não tratados. Já o tratamento por 24 horas com IL-10 (Figura 6B) induziu diminuição na expressão de Fas/CD95 nas células tratadas e infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*, em relação aos controles infectados e não tratados.

Em relação ao tratamento com TGF- β 1, houve diminuição na expressão do receptor de morte tanto nas células tratadas e infectadas pelas cepas RH ou ME49, quanto nas células não infectadas e tratadas, após 2 e 24 horas de tratamento (Figuras 5B e 6B). Essas diferenças foram observadas quando a expressão de Fas/CD95 dessas células tratadas foi comparada com a expressão do receptor nos respectivos controles não tratados.

5.5 O aumento da apoptose em células BeWo infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* e/ou tratadas com as citocinas MIF, TNF- α ou IFN- γ está associado ao aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95.

A análise da associação entre o índice de apoptose de células BeWo infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* e a expressão do receptor de morte Fas/CD95 demonstrou que, após 2 e 24 horas, o aumento do índice de apoptose está associado com o aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95 observado após a infecção pela cepa ME49 (Figuras 7 e 8). Esses resultados são mais evidentes em células infectadas pela cepa ME49 por 24 horas, uma vez que, à medida que houve aumento na expressão do receptor Fas/CD95 observou-se também aumento no índice de apoptose quando comparado com as células não infectadas. Já em células BeWo infectadas pela cepa RH do parasito essa associação não foi observada, pois

apesar de se observar aumento na expressão do receptor de morte após a infecção, por 24 horas, o índice de apoptose diminuiu quando comparado com o controle não infectado (Figuras 7 e 8).

Para determinar se havia associação entre o índice de apoptose e a expressão do receptor Fas/CD95 em células tratadas com as citocinas MIF, TNF- α e IFN- γ , que induziram tanto aumento no índice de apoptose quanto na expressão do receptor de morte, realizou-se análise de associação após o tratamento com cada uma dessas citocinas (Figura 7).

Após o tratamento com MIF (Figura 7A) observou-se associação entre o aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95 e o aumento no índice de apoptose, quando as células estão infectadas pelas cepas RH ou ME49 de *T. gondii*, nos dois tempos de incubação analisados.

Em relação ao tratamento com as citocinas TNF- α e IFN- γ (Figuras 7B, C), foi possível observar que há associação entre o aumento do índice de apoptose e o aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95 e essa associação é consequência do tratamento com essas citocinas. Uma vez que, após o tratamento com essas citocinas, houve aumento na expressão do receptor de morte e também aumento no índice de apoptose tanto em células infectadas com as cepas RH ou ME49 quanto em células não infectadas, após 2 e 24 horas de incubação. Já o tratamento com IFN- γ não está associado ao aumento da apoptose e expressão do receptor de morte em células tratadas mas não infectadas no tempo de 2 horas de incubação (Figura 7C).

Esses resultados sugerem que a maior expressão de receptor de morte Fas/CD95 em células BeWo infectadas com a cepa ME49 está associada com os altos índices de apoptose observados após a infecção por essa cepa.

5.6 O menor índice apoptose em células BeWo após o tratamento com as citocinas IL-6, IL-10 e TGF- β 1 está associado com a menor expressão do receptor de morte Fas/CD95.

Após o tratamento das células BeWo com as citocinas IL-6, IL-10 e TGF- β 1 observou-se diminuição tanto no índice de apoptose quanto na expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células infectadas pelas cepas RH ou ME49 e em células não infectadas. Dessa forma, realizou-se análise para determinar se este decréscimo está associado com o tratamento por essas citocinas.

A análise do tratamento com IL-6, após 2 horas de incubação, revelou que a diminuição do índice de apoptose em células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com a citocina, está associada com a diminuição da expressão do receptor Fas/CD95. Após 24 horas de incubação com IL-6, observou-se associação entre a diminuição do índice de apoptose e a diminuição da expressão do receptor de morte tanto nas células infectadas pelas cepas RH ou ME49 quanto nas células não infectas (Figura 8A).

Após o tratamento de células com TGF- β 1, por 2 horas, observou-se que o tratamento está associado com a diminuição do índice de apoptose nas células BeWo infectadas com a cepa ME49 e a diminuição da expressão de Fas/CD95. Além disso, após 24 horas de incubação observou-se associação entre a diminuição do índice de apoptose e a menor expressão do receptor de morte após o tratamento com TGF- β 1 nas células infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* e nas células não infectadas pelo parasito (Figura 8B).

O tratamento com IL-10 por 2 horas, está associado com a diminuição do índice de apoptose e a diminuição na expressão do receptor Fas/CD95 em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*. Após 24 horas de incubação com IL-10 verificou-se associação tanto nas células infectadas com as cepas RH ou ME49 quanto nas células não infectadas pelo parasito (Figura 8C).

Esses resultados demonstram que a diminuição da apoptose observada nas células BeWo após o tratamento com IL-6 e com as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β 1, mesmo após a infecção com a cepa ME49 que induz apoptose, está associada com a diminuição na expressão do receptor de morte Fas/CD95 induzida pelo tratamento com as referidas citocinas.

5.7 A expressão relativa da proteína ERK1/2 fosforilada é maior em células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii*, após 24 horas de infecção.

Para determinar se as diferenças nos índices de apoptose observadas entre as células infectadas e não infectadas e entre as duas cepas de *T. gondii* relacionam-se com a expressão de proteínas intracelulares da família das MAPK analisou-se a fosforilação da proteína desta família, ERK1/2, e a expressão da proteína survivina que pertence a família de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Para isso, células BeWo foram plaqueadas, cultivadas por 24 horas e, em seguida, infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*, por 2 e 24 horas. Após esses tempos as células foram lisadas, realizou-se dosagem proteica dos lisados e os mesmos foram submetidos a reação de Western blotting para detecção de ERK1/2 fosforilada (Figura 9A) e survivina (Figura 10A).

Após 2 horas de infecção, foi possível observar menor fosforilação da proteína ERK1/2 em células BeWo infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* (Figura 9B). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas nas outras condições nesse horário.

Após 24 horas de infecção, observou-se diminuição na fosforilação de ERK1/2 em células BeWo não infectadas quando comparado com o controle de 2 horas. Além disso, células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii* apresentaram maior fosforilação de ERK1/2 do que células não infectadas e células infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii*, após 24 horas de infecção (Figura 9B).

Em relação à expressão de survivina, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhuma das condições analisadas. Demonstrando que a infecção pelas cepas RH ou ME49 de *T. gondii*, nos dois horários analisados, não modificou a expressão de survivina quando comparado com células BeWo não infectadas (Figura 10B).

6. Discussão

A apoptose é um processo essencial para o desenvolvimento embrionário, já que esse tipo de morte celular é importante na eliminação e remoção de células embrionárias danificadas ou não desejadas e, também, essencial no desenvolvimento da placenta (CHEN et al., 2011). Dessa forma, esse mecanismo de morte celular é crucial durante a gestação, uma vez que a diminuição ou o aumento de apoptose nas células trofoblásticas pode acarretar complicações durante a gestação, causando inclusive abortos (LEE et al., 2005; LI et al., 2012). Estudos demonstraram que alterações na incidência de apoptose durante os períodos iniciais de gestação podem causar alterações na morfologia e nos aspectos fisiológicos da placenta, comprometendo o desenvolvimento fetal (HEAZELL; CROCKER, 2008; CHEN et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que o aumento da apoptose em células trofoblásticas está associado com a patogênese observada em casos de pré-eclâmpsia (ZHANG et al., 2012). Além disso, a apoptose é um importante mecanismo de defesa, tanto da imunidade inata quanto adaptativa, contra microorganismos (LÜDER et al., 2010). Entretanto, vírus, bactérias e protozoários desenvolveram mecanismos de evasão capazes de modular o processo de apoptose da célula hospedeira, garantindo a sobrevivência no interior das células.

Toxoplasma gondii é um dos protozoários com capacidade de manipulação não só da apoptose da célula hospedeira, mas também outras vias celulares importantes, como regulação da glicólise, metabolismo de lipídeos e colesterol, organização do citoesqueleto e ciclo celular (LÜDER et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012). A capacidade de *T. gondii* de atravessar barreiras biológicas, como a placenta, e alterar o programa apoptótico das células hospedeiras é um importante fator para o sucesso da infecção e está diretamente relacionada a cepa do parasito (ROBBINS et al., 2011). Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a incidência da apoptose em células trofoblásticas BeWo é modulada de forma diferente pelas

cepas de *T. gondii*. Células BeWo infectadas com a cepa RH apresentaram menor índice de apoptose do que as células não infectadas, diferente das infectadas pela cepa ME49 do parasito apresentaram maiores índices de apoptose do que as células infectadas pela cepa RH ou não infectadas (ANGELONI et al., 2009). Esses resultados foram confirmados no presente trabalho.

O principal objetivo desse trabalho foi analisar possíveis fatores que podem estar associados com essa apoptose diferencial em células trofoblásticas infectadas com diferentes cepas de *T. gondii*, cepa de alta virulência e de virulência moderada. Quando analisou-se a produção de citocinas em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* foi possível observar que, nos tempos de infecção de 2 e 24 horas, células infectadas com a cepa ME49 demonstraram um perfil de secreção de citocinas oposto ao observado em células infectadas com a cepa RH do parasito. Células BeWo infectadas com a cepa ME49 exibiram perfil de resposta predominantemente pró-inflamatório, com maior secreção de MIF, IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-17A, enquanto células infectas com a cepa RH apresentaram maior produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β 1 e IL-10. Esse perfil de produção de citocinas pode estar associado ao padrão de resposta imunológica que resulta em um controle efetivo da infecção, como o observado em infecções por cepas de baixa virulência como a ME49. Semelhante ao observado por nós, Robben e colaboradores (2004) demonstraram que após a infecção de macrófagos com cepa do tipo II de *T. gondii* havia uma polarização da resposta imune para um perfil do tipo Th1, caracterizado pela maior produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-12. Estudos realizados em modelo de gestação *in vivo*, também demonstraram que a infecção pela cepa ME49 induz secreção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ (SENEGAS et al., 2009). Além disso, estudos demonstraram que parasitos da cepa RH podem subverter a resposta inflamatória do hospedeiro, uma vez que esses parasitos podem atuar induzindo aumento da produção de

citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6 (BUTCHER et al., 2001, 2005; LANG et al., 2007; LÜDER et al., 2009).

Além disso, cepas do tipo I de *T. gondii* são capazes de induzir fosforilação prolongada dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6, via ROP16 e essa fosforilação atua diminuindo a indução da produção de IL-12. Já as cepas do tipo II do parasito não são capazes de manter a fosforilação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6, resultando em alta produção de IL-12 após a infecção por essas cepas de *T. gondii*. Essas alterações, no perfil de secreção de citocinas induzidas pelas diferentes cepas de *T. gondii*, podem estar associadas as estratégias que o parasito desenvolve para subverter mecanismos antiparasitários da célula hospedeira, uma vez que o sucesso da infecção depende de mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro desenvolvidos pelo parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Com o objetivo de verificar se o perfil de produção de citocinas relaciona-se com a incidência de apoptose em células trofoblásticas, células BeWo foram tratadas com as citocinas recombinantes MIF, TNF- α , IFN- γ , IL-6, TGF- β 1 ou IL-10 por 24 horas, infectadas com as cepas RH ou ME49 por 3 horas e, novamente tratadas com as mesmas citocinas por mais 2 e 24 horas. Os resultados demonstraram que o tratamento com as citocinas pró-inflamatórias MIF, TNF- α e IFN- γ induziram aumento no índice de apoptose em células BeWo infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii*, nos dois tempos de incubação analisados. Esses resultados podem estar associados ao fato de que a infecção de células pela cepa de moderada virulência ME49, induz aumento na apoptose dessas células como uma forma de atenuar a infecção pelo parasito, demonstrando um possível mecanismo de evasão desta cepa. Estudos demonstraram uma estreita ligação entre a indução de apoptose por patógenos e os efeitos de morte celular na resistência à infecção, indicando que muitas vezes a indução da apoptose pelo parasito tem um efeito protetor para o hospedeiro. Essa situação foi observada

em estudos realizados com a bactéria *Helicobacter pylori* e demonstraram que camundongos infectados pela bactéria e deficientes em receptor de morte Fas/CD95, apresentam aumento na gravidade de doenças gástricas (LABBÉ; SALEH, 2008).

Células infectadas com a cepa RH de *T. gondii* e tratadas com as citocinas pró-inflamatórias MIF, TNF- α e IFN- γ , apresentaram índice de apoptose maior do que as células infectadas e não tratadas, mas, menor quando comparado com o índice de apoptose de células não infectadas e tratadas. Esses resultados mostram que mesmo após o tratamento das células com essas citocinas pró-inflamatórias a cepa RH, de alta virulência, é capaz de modular a morte da célula hospedeira, inibindo o processo de apoptose dessas células. Esses resultados também foram observados em outros estudos que demonstraram que células infectadas pela cepa RH são resistentes a apoptose mesmo após o tratamento dessas células com estímulos indutores de apoptose, como radiação UV, citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos, privação de fatores de crescimento e tratamento com várias toxinas (LANG et al., 2007; VUTOVA et al., 2007; BANNAI et al., 2008, YAMADA et al., 2011). Além disso, as diferenças no índice de apoptose observadas com a infecção das duas diferentes cepas podem estar associadas com fatores de virulência das mesmas. Estudos demonstraram que os fatores de virulência específicos aos tipos de cepas de *T. gondii* interferem de formas diferentes na resposta imune de camundongos infectados. Animais submetidos à infecção por cepas de *T. gondii* do tipo I (cepas de alta virulência) apresentaram menor produção de IL-12 e diminuição na eliminação do parasito nesses animais. No entanto, camundongos infectados com as cepas de moderada virulência, tipo II, demonstraram maior produção de IL-12 e aumento na eliminação do parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012). Esses dados reforçam os nossos resultados, uma vez que as diferenças observadas entre as cepas de *T. gondii* podem estar associadas com o perfil de citocinas secretadas após a infecção com as diferentes cepas do parasito. Além disso, as diferenças na eliminação do parasito observadas entre as cepas,

nos estudos de Hunter e Sibley (2012), podem estar relacionadas com a ocorrência de apoptose nas células hospedeiras. O fato de haver menor índice de apoptose em células infectadas pela cepa RH (tipo I) pode resultar em menor eliminação do parasito. Já o aumento da apoptose das células hospedeiras observado após a infecção pela cepa ME49 (tipo II) pode induzir maior eliminação de *T. gondii*.

Os fatores de virulência associados às diferentes cepas de *T. gondii* estão relacionados com os danos que a infecção pelo parasito pode causar ao hospedeiro (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Os fatores de virulência das cepas do tipo I que interferem nas vias intracelulares da célula hospedeira auxiliam o parasito a evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro, garantindo a expansão parasitária e o estabelecimento da resposta inflamatória em um primeiro momento. No entanto, esse acelerado crescimento parasitário resulta, em momentos mais avançados da infecção, em danos teciduais e uma resposta inflamatória secundária intensa, resultando em uma patologia grave, observada após a infecção por parasitos de cepas do tipo I de *T. gondii* (HUNTER; SIBLEY, 2012; DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). De forma oposta, cepas de moderada virulência (cepas do tipo II) possuem fatores de virulência que estão associados com a indução de resposta inflamatória primária, no sentido de conter a disseminação parasitária e, conseqüentemente, estabelecem uma reposta imunológica protetora (HUNTER; SIBLEY, 2012; DUBREMETZ; LEBRUN, 2012).

Interessantemente, o tratamento com a citocina pró-inflamatória IL-6 reduziu o índice de apoptose em células BeWo infectadas por RH ou ME49 e não infectadas pelo parasito. Esses resultados podem estar relacionados com o fato de IL-6 possuir capacidade de promover o bloqueio da morte celular. Estudos demonstraram que IL-6 atua inibindo a apoptose por meio da ativação da via de sinalização intracelular da proteína ERK1/2, da família das MAPK, além disso, a citocina ativa o fator de transcrição NF- κ B, que também está relacionado com o bloqueio da apoptose (NAUGLER; KARIN, 2008; TU et al., 2012).

Resultados semelhantes ao do tratamento com IL-6 foram observados após o tratamento das células BeWo com as citocinas IL-10 e TGF- β 1, demonstrando que essas citocinas podem estar associadas com a diminuição da apoptose. Esses resultados estão de acordo com estudos que demonstram que essas citocinas de perfil anti-inflamatório possuem a capacidade de diminuir o processo de morte celular por meio da diminuição da expressão de receptores de morte, como Fas/CD95 (ASCHKENAZI et al., 2002). Além disso, estudos recentes demonstraram que o tratamento de células BeWo, com IL-10, diminui a apoptose em células infectadas por *T. gondii*, por meio de um aumento na expressão da proteína anti-apoptótica cFLIP e diminuição na expressão das caspases 3 e 8 (ZHAO et al., 2013).

Para verificar possíveis fatores envolvidos nessa diferença de incidência da apoptose após a infecção pela cepa RH ou ME49 de *T. gondii* e, após o tratamento de células BeWo infectadas e não infectadas com citocinas pró ou anti-inflamatórias, analisou-se a expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células BeWo em diferentes condições. Para essa análise, células BeWo foram tratadas com citocinas recombinantes MIF, TNF- α , IFN- γ , IL-6, TGF- β 1 ou IL-10, por 24 horas, infectadas com as cepas RH ou ME49 por 3 horas e, novamente tratadas com as mesmas citocinas por mais 2 e 24 horas. Foi observado que, nos dois tempos de incubação analisados, células infectadas com a cepa ME49 apresentaram aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95 quando comparado com células não infectadas ou infectadas com a cepa RH, após 2 horas de incubação. A indução de apoptose pela cepa ME49 pode estar relacionada com a indução de maior expressão de receptor de morte nas células hospedeiras em consequência da infecção. Uma vez que houve associação entre os altos índices de apoptose observados após a infecção pela cepa ME49 e a maior expressão do receptor de morte observada após a infecção pelo parasito. Além disso, a expressão do receptor também foi maior em células infectadas com a cepa RH em relação às não infectadas, no período de 24 horas de incubação, indicando que a inibição da apoptose em

células BeWo infectadas com a cepa RH não está relacionada com a expressão do receptor de morte Fas/CD95. Não observamos associação entre a diminuição do índice de apoptose e expressão de receptor de morte observadas após a infecção pela cepa RH de *T. gondii*, demonstrando que mesmo com a maior expressão de receptor de morte pela célula hospedeira o parasito ainda é capaz de bloquear a apoptose dessas células. Esses resultados podem ser explicados pela capacidade que parasitos da cepa RH possuem de interferir nas vias de sinalização intracelulares das células hospedeiras (CARMEN; SINAI, 2011; SONG et al., 2012). O efeito anti-apoptótico, induzido por *T. gondii*, está associado com o aumento na expressão de genes anti-apoptóticos, como ativação da via de NF- κ B (PENG et al., 2011). Além disso, o parasito é capaz de bloquear a liberação do citocromo c pela mitocôndria, inibir a ação das caspases 9, 8 e 3 e induzir aumento na expressão das proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) (HIPPE et al., 2008; GUILLERMO et al., 2008; CARMEN; SINAI, 2011).

A expressão do receptor de morte Fas/CD95 também está associada com o tipo de citocina com a qual a célula foi tratada. No geral, as citocinas pró-inflamatórias como MIF, IFN- γ e TNF- α induziram aumento na expressão do receptor de morte, esse aumento foi mais acentuado em células BeWo infectadas com a cepa ME49, já que a mesma também atua induzindo aumento na expressão do receptor nessas células. Em contraste, o tratamento com IL-6, TGF- β 1 e IL-10 diminui a expressão de Fas/CD95 em células BeWo mesmo após a infecção das células pela cepa ME49 de *T. gondii*. Esses achados foram evidentes quando analisou-se a associação entre a expressão do receptor de morte e o índice de apoptose das células BeWo após o tratamento com as citocinas citadas acima. Observou-se associação entre o maior índice de apoptose em células BeWo e o aumento na expressão de Fas/CD95 após o tratamento com as citocinas como MIF, TNF- α e IFN- γ . Já em relação ao tratamento com IL-6, IL-10 e TGF- β 1 foi possível observar associação entre o menor índice de apoptose e a

diminuição da expressão do receptor de morte, após o tratamento com essas citocinas. Esses resultados estão de acordo com outro estudo que demonstrou que após o tratamento de células trofoblásticas com IFN- γ e TNF- α a expressão do receptor de morte Fas/CD95 foi aumentada, enquanto que os tratamentos com IL-10 e IL-6 diminuíram a expressão desse receptor nas células trofoblásticas (ASCHKENAZI et al., 2002). Estudos recentes demonstraram que TGF- β 1 possui dupla atividade na indução de apoptose das células, podendo induzir a morte celular ou bloqueá-la, essa dupla atividade está relacionada com a indução da expressão do receptor Fas/CD95 e está associada com o tipo celular e o tempo de tratamento da célula com esta citocina (BAI et al., 2011). Além disso, a baixa expressão do receptor de morte observada em células BeWo tratadas com a citocina IL-6 pode estar relacionada com a diminuição do índice de apoptose nessas células após o tratamento com a citocina, mesmo IL-6 sendo considerada uma citocina pró-inflamatória.

As diferenças na virulência entre as cepas de *T. gondii* estão associadas com os tipos de vias intracelulares da célula hospedeira que o parasito interfere (HUNTER; SIBLEY, 2012). Para determinar se as diferenças observadas entre as cepas de *T. gondii* estão associadas com a interferência do parasito nas vias de sinalização intracelulares, analisou-se a expressão das proteínas com características anti-apoptóticas ERK1/2 fosforilada (uma proteína da família das MAPK) e survivina (uma proteína da família das IAPs). Células BeWo foram infectadas com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii*, por 2 e 24 horas, e após as células serem lisadas, foi realizado Western blotting para detecção das proteínas citadas acima. Em relação a ERK1/2 fosforilada, após 2 horas de infecção, observou-se menor fosforilação da proteína em células infectadas pela cepa ME49 quando comparado com o controle. No entanto, não foi observada diferença estatística entre células infectadas com a cepa RH quando comparado com células não infectadas. Esses resultados podem estar associados ao fato de que nos estágios iniciais da infecção, parasitos da cepa RH de *T. gondii*

são hábeis em ativarem vias de inibição de apoptose que não estão relacionadas com a expressão de ERK1/2. Estudos recentes demonstraram que nos estágios iniciais da infecção pela cepa RH de *T. gondii*, a interferência na via de PI3-kinase é o principal fator relacionado com a inibição da apoptose em células hospedeiras. Uma vez que, a utilização de inibidores dessa via cessam a atividade anti-apoptótica mediada por parasitos da cepa RH de *T. gondii* (QUAN et al., 2013). Além disso, Molestina e colaboradores (2008) determinaram a cinética de fosforilação de ERK1/2 em cultura de fibroblastos humanos (linhagem HFF) infectados com a cepa RH de *T. gondii* e observaram que no início da infecção a fosforilação de ERK1/2 é inconstante e, esta fosforilação se estabelece em altos níveis apenas após 24 horas de infecção.

Após 24 horas de infecção, observou-se diminuição fosforilação de ERK1/2 em células BeWo não infectadas ou infectadas pela cepa ME49 de *T. gondii* quando comparado com o tempo de 2 horas de infecção. No entanto, essa diminuição não foi observada em células BeWo infectadas com a cepa RH do parasito e foi possível observar maior fosforilação ERK1/2 nas células infectadas com essa cepa de *T. gondii* quando comparado com as células não infectadas ou infectadas pela cepa ME49. Esses resultados indicam uma possível interferência do parasito da cepa de alta virulência na fosforilação de ERK1/2 e podem explicar a menor incidência de apoptose observada após a infecção das células BeWo por essa cepa de *T. gondii*. De forma semelhante aos nossos resultados, estudos demonstraram que células infectadas pela cepa RH de *T. gondii* induzem aumento na fosforilação de ERK, mas esses estudos não associam a maior fosforilação de ERK1/2 com a inibição de apoptose mediada por essa cepa (KIM et al., 2006; KIM; DENKERS, 2006; MOLESTINA et al., 2008). Em condições normais, as vias PI3-K e das MAPK, como a de ERK1/2, podem promover a fosforilação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como Bad, Bax e Bim, induzindo a degradação citoplasmática dessas proteínas e conferindo sinais de sobrevivência

para a célula (RODRIGUES et al., 2012). Além disso, trabalhos demonstraram que parasitos, como *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, bloqueiam a apoptose da célula hospedeira promovendo a ativação da proteína ERK1/2. Kamir e colaboradores (2008) demonstraram que parasitos da espécie *Leishmania major* inibiram a apoptose de macrófagos quando os mesmos foram tratados com óxido nítrico e que essa inibição associa-se com a ativação da via de sinalização de ERK1/2. De forma semelhante, cardiomiócitos de camundongos infectados com *T. cruzi* apresentaram diminuição da apoptose após serem cultivados sem suplementação de soro no meio de cultura e essa diminuição da apoptose está associada com a ativação da via de ERK1/2 (AOKI MDEL et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que a expressão da proteína survivina não alterou em nenhuma das condições analisadas, sugerindo que em células trofoblásticas BeWo *T. gondii* não interfere na via de sinalização dessa proteína. Estudos demonstraram que em fibroblastos infectados com a cepa RH de *T. gondii* a inibição da apoptose está relacionada com a maior expressão de IAPs (MOLESTINA et al., 2003; BLADER et al., 2001). Apesar das células trofoblásticas expressarem proteínas da família das IAPs (LI et al., 2012), não há trabalhos que demonstrem a modulação de *T. gondii* nessas proteínas nesse tipo celular. Dessa forma, nossos resultados sugerem que em células BeWo a proteína da família das MAPK, ERK1/2, está mais relacionada com a inibição da apoptose do que a proteína da família das IAPs, a survivina, quando essas células estão infectadas pela cepa RH de *T. gondii*.

Finalmente, nossos resultados demonstraram os mecanismos opostos na interferência da apoptose em células trofoblásticas BeWo observados após a infecção pelas cepas de alta virulência RH ou de moderada virulência ME49. Estes achados podem estar associados com os fatores de virulência das cepas de *T. gondii*, bem como com o perfil de citocina secretada. Além disso, a alta incidência de apoptose em células BeWo, infectadas com a cepa ME49, pode ser explicada pelo aumento na expressão do receptor de morte Fas/CD95 após a infecção

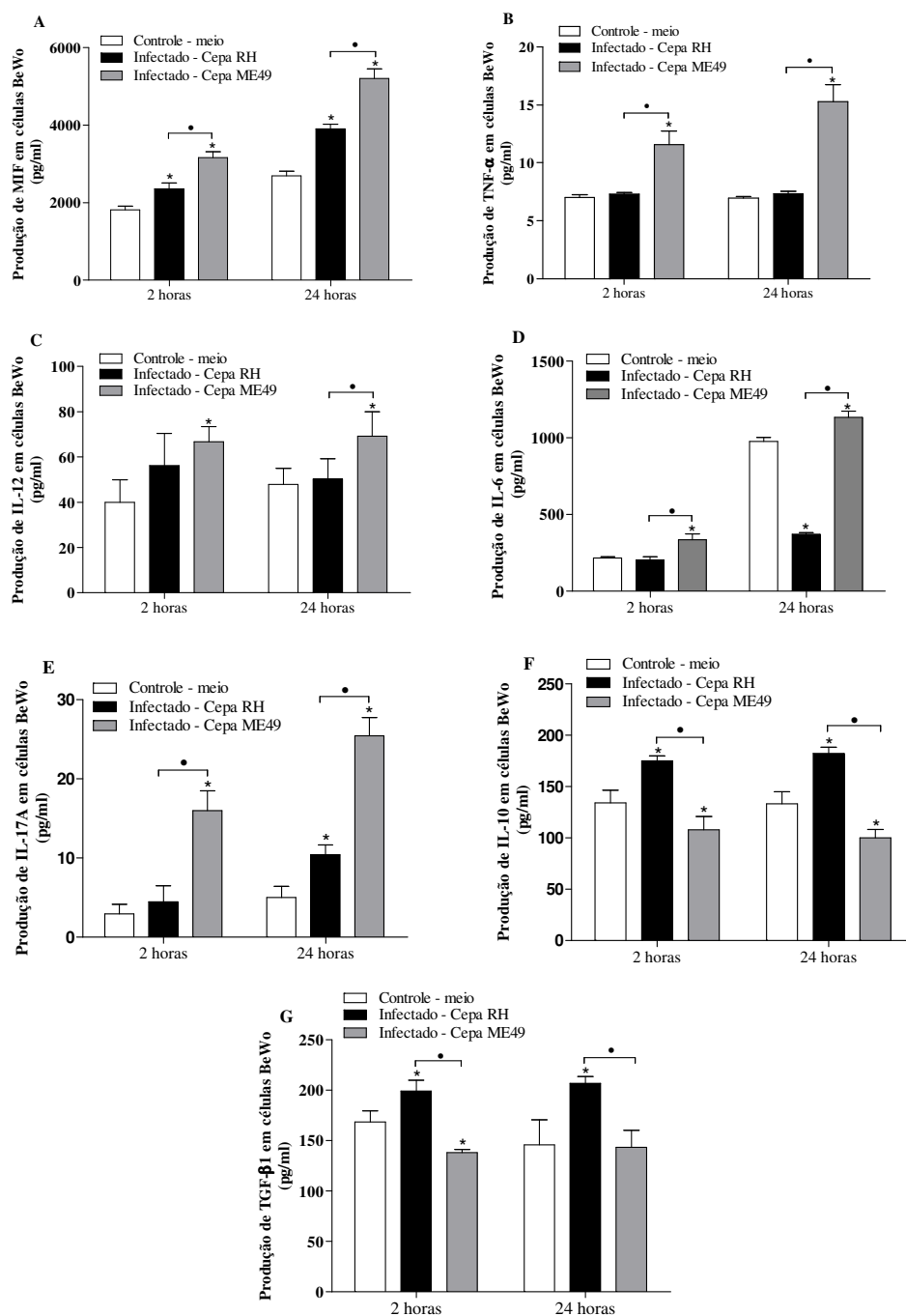
das células trofoblásticas por essa cepa do parasito. Enquanto o menor índice de apoptose observado em células infectadas pela cepa RH pode estar associado à interferência do parasito nas vias de sinalização intracelulares como a mediada por ERK1/2. As alterações na ocorrência da apoptose em células trofoblásticas BeWo sugerem mecanismos cepa dependentes no microambiente placentário e podem explicar as diferentes patogenias placentárias e fetais no curso da infecção por *T. gondii* durante a gestação.

7. Conclusões

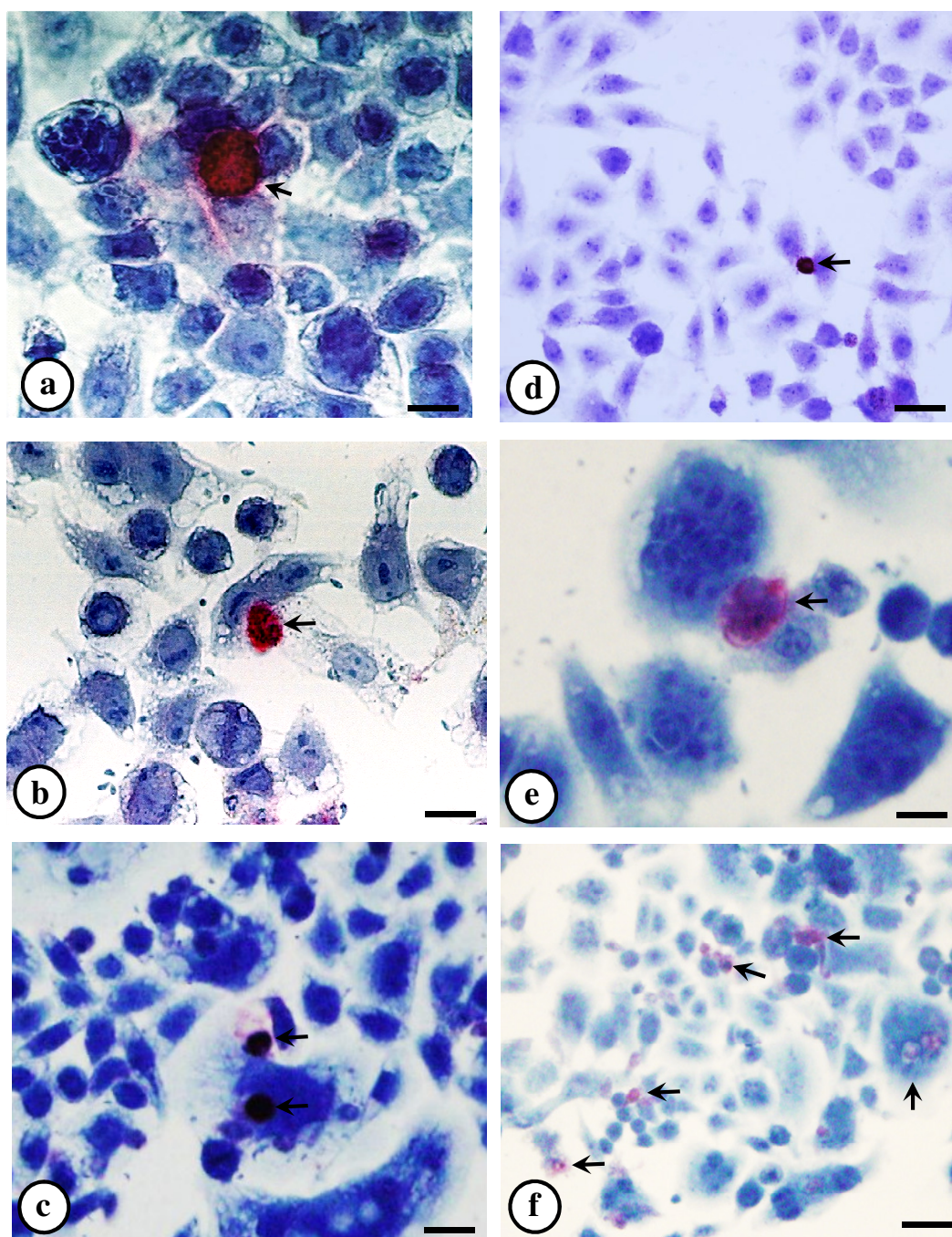
- Células infectadas com a cepa RH de *T. gondii* induzem a secreção das citocinas de perfil anti-inflamatório (TGF- β 1 e IL-10) e secreção aumentada de IL-6. Enquanto, as infectadas com a cepa ME49 apresentam aumento das citocinas pró-inflamatórias (MIF, TNF- α , IL-12 e IL-17A).
- Células BeWo tratadas com as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , apresentam maior índice de apoptose do que as não tratadas. Já em células BeWo tratadas com as citocinas IL-6, TGF- β e IL-10 ocorre diminuição no índice de apoptose.
- Células BeWo, infectadas com a cepa RH de *T. gondii* são capazes de controlar o índice de apoptose mesmo após o tratamento com as citocinas pró-inflamatórias MIF, TNF- α e IFN- γ . Enquanto, o índice de apoptose é reduzido em células infectadas com a cepa ME49 e tratadas com IL-6, IL-10 e TGF- β 1.
- Células BeWo, infectadas com as cepas RH ou ME49 apresentam expressão aumentada do receptor de morte Fas/CD95 em relação as não infectadas. Além disso, a expressão desse receptor está associada com o tipo de citocina que as células são tratadas.
- O aumento no índice de apoptose, observado em células BeWo infectadas com a cepa ME49, pode estar associado com aumento na expressão do receptor Fas/CD95.
- A fosforilação da proteína anti-apoptótica ERK1/2, em células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii*, aumenta após 24 horas de infecção. Esse aumento pode estar relacionado com o menor índice de apoptose observado em células infectadas com a cepa RH.
- Não houve alteração na expressão da proteína anti-apoptótica survivina em células BeWo infectadas com as cepas RH e ME49 de *T. gondii*.

8. Figuras

Figura 1

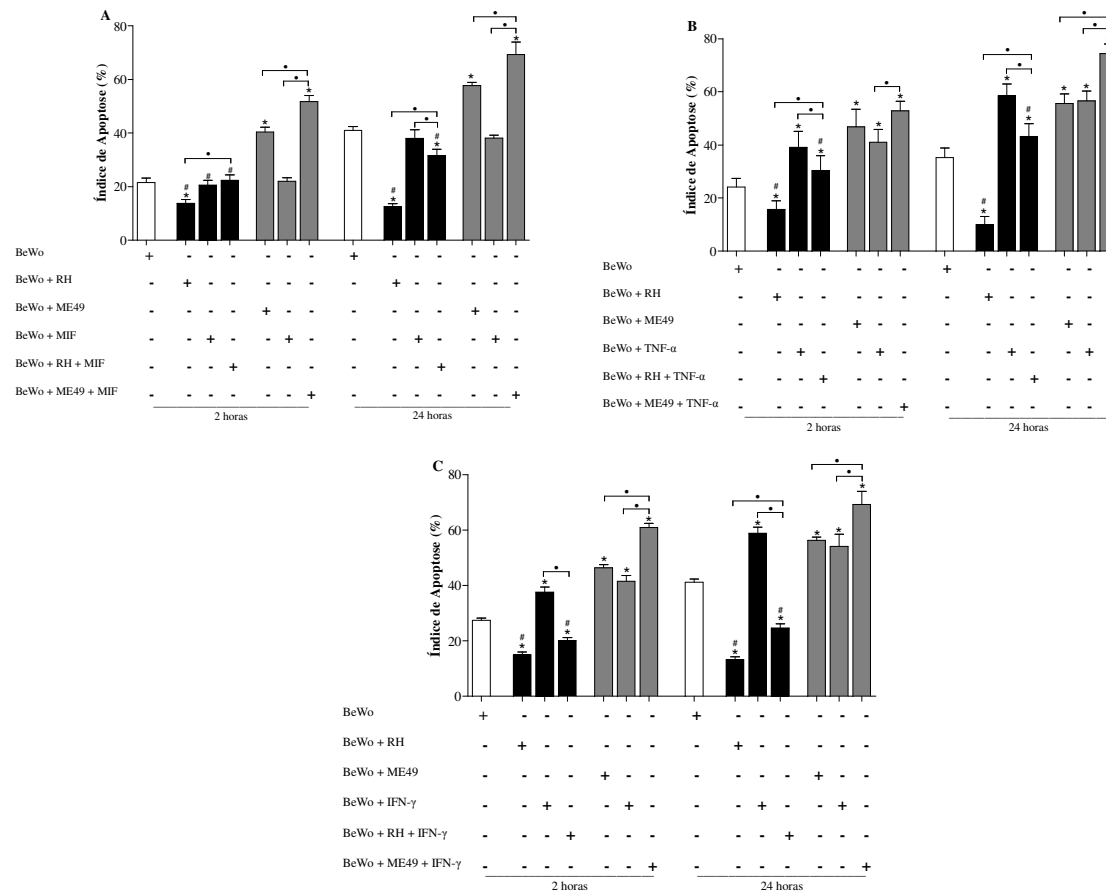


Deteção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de células trofoblásticas BeWo incubadas apenas com meio de cultura (controle) e infectadas pelas cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*, na proporção de 5 parasitos por célula. Os sobrenadantes da cultura foram coletados após 2 e 24 horas de infecção e analisados, por ELISA e CBA, quanto a produção das citocinas MIF (A), TNF- α (B), IL-12 (C), IL-6 (D), IL-17A (E), IL-10 (F) e TGF- β 1 (G). Os dados representam a média \pm SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Foram observadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) quando comparou-se células infectadas com células não infectadas (*) e as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (•).

Figura 2

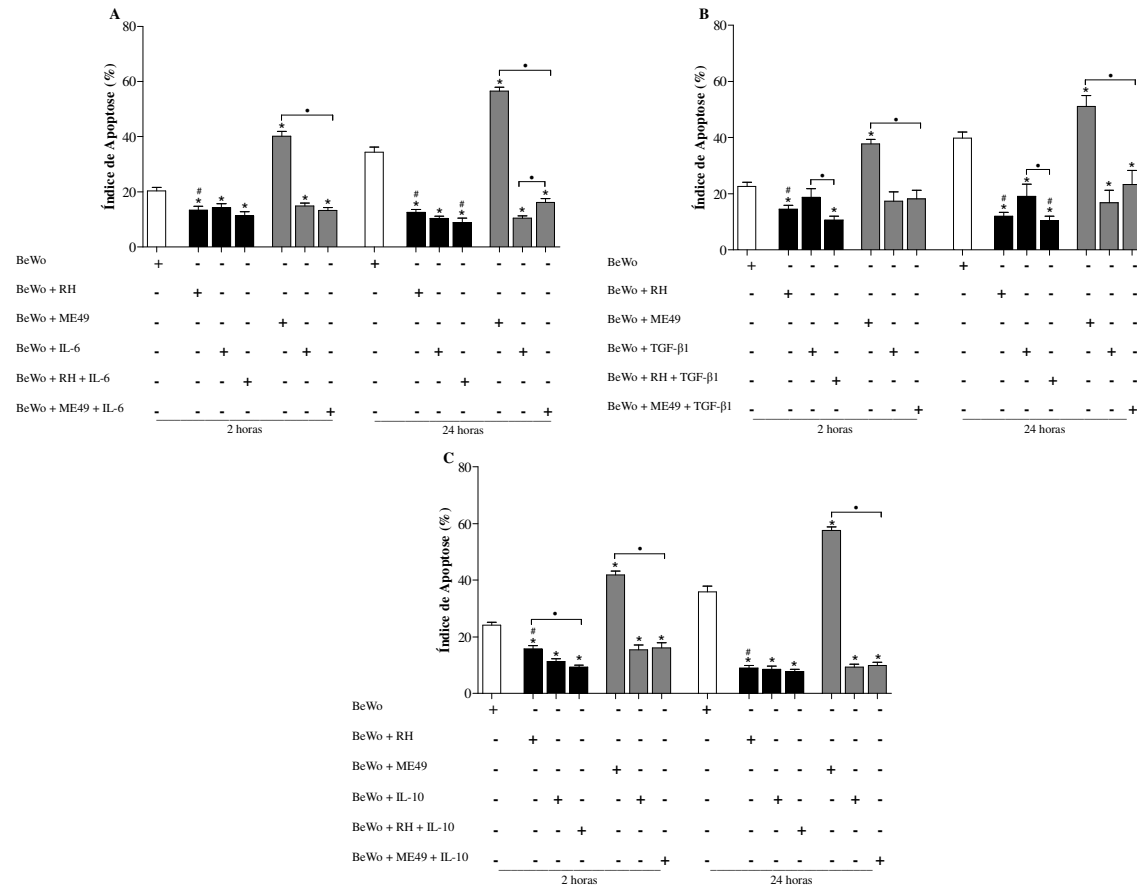
Imunomarcações de células BeWo em apoptose após 2 horas (a – c) e 24 horas (d – f) de infecção. (a, d) células não infectadas (controle); (b, e) células infectadas com a cepa RH de *T. gondii*; (c, f) infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii*. As imunomarcações de células apoptóticas estão indicadas pelas setas. Imunomarcção por imuno-histoquímica com anticorpo M30 utilizando fosfatase alcalina e *fast red naphthol*, contra-coloração com hematoxilina de Meyer. Barras - a, b, c: 25µm; d, f: 100µm; e: 10µm.

Figura 3



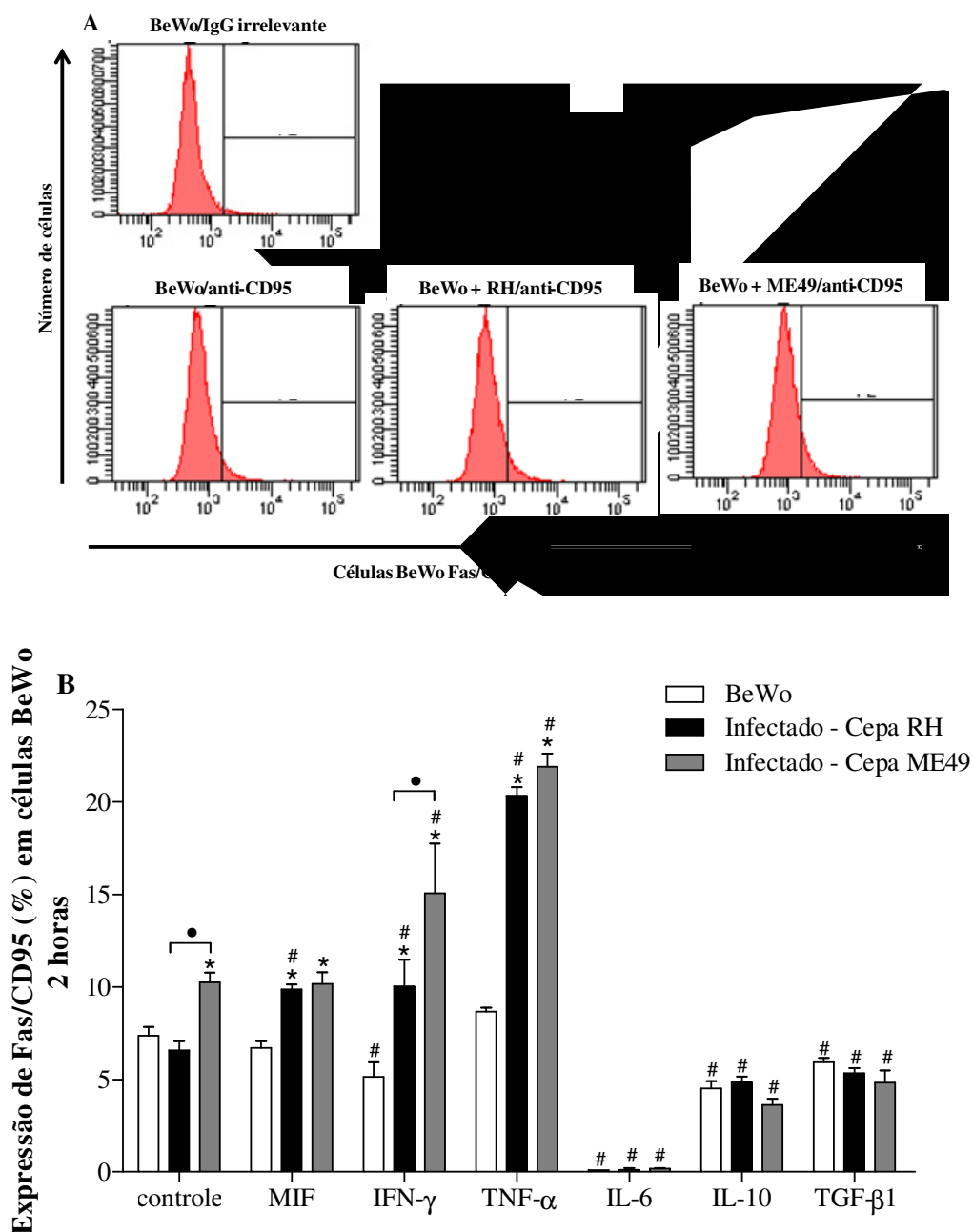
Influência das cepas RH e ME49 de *Toxoplasma gondii* no índice de apoptose (%) de células trofoblásticas. Células BeWo foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes MIF (A), TNF- α (B) ou IFN- γ (C) – 15ng/ml – por 24 horas, infectadas por três horas e novamente tratadas com as mesmas citocinas por 2 e 24 horas. O índice de apoptose foi determinado pelo número médio de imunomarcações em cada 100 células examinadas. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Foram observadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) quando comparou-se o controle (células não infectadas e não tratadas) com as outras condições experimentais (*), as diferentes condições para cada cepa de *T. gondii* (•) e as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (#).

Figura 4



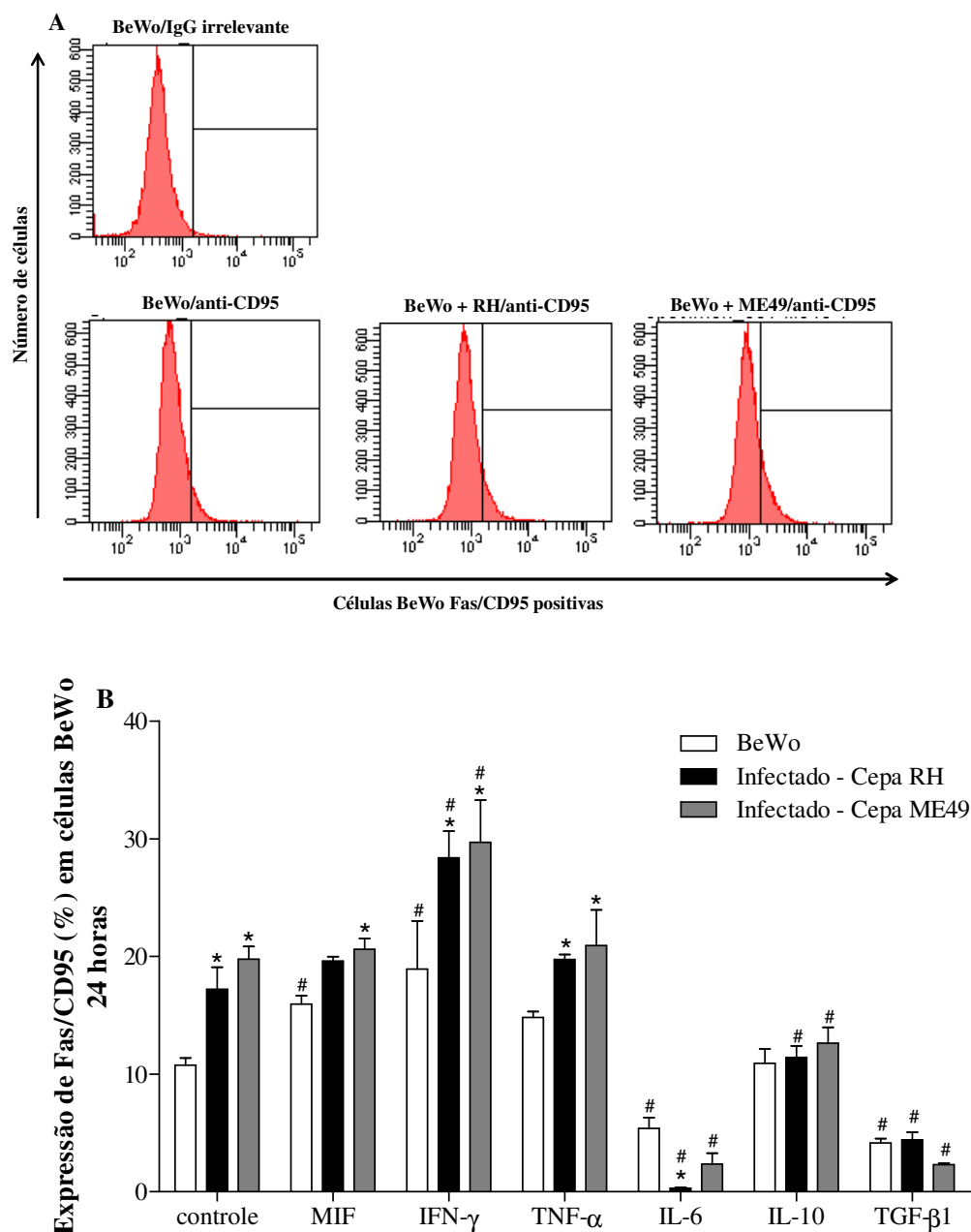
Influência das cepas RH e ME49 de *Toxoplasma gondii* no índice de apoptose (%) de células trofoblásticas. Células BeWo foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes IL-6 (A), TGF-β1 (B) ou IL-10 (C) – 15ng/ml – por 24 horas, infectadas por três horas e novamente tratadas com as mesmas citocinas por 2 e 24 horas. O índice de apoptose foi determinado pelo número médio de imunomarcações em cada 100 células examinadas. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Foram observadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) quando comparou-se o controle (células não infectadas e não tratadas) com as outras condições experimentais (*), as diferentes condições para cada cepa de *T. gondii* (•) e as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (#).

Figura 5



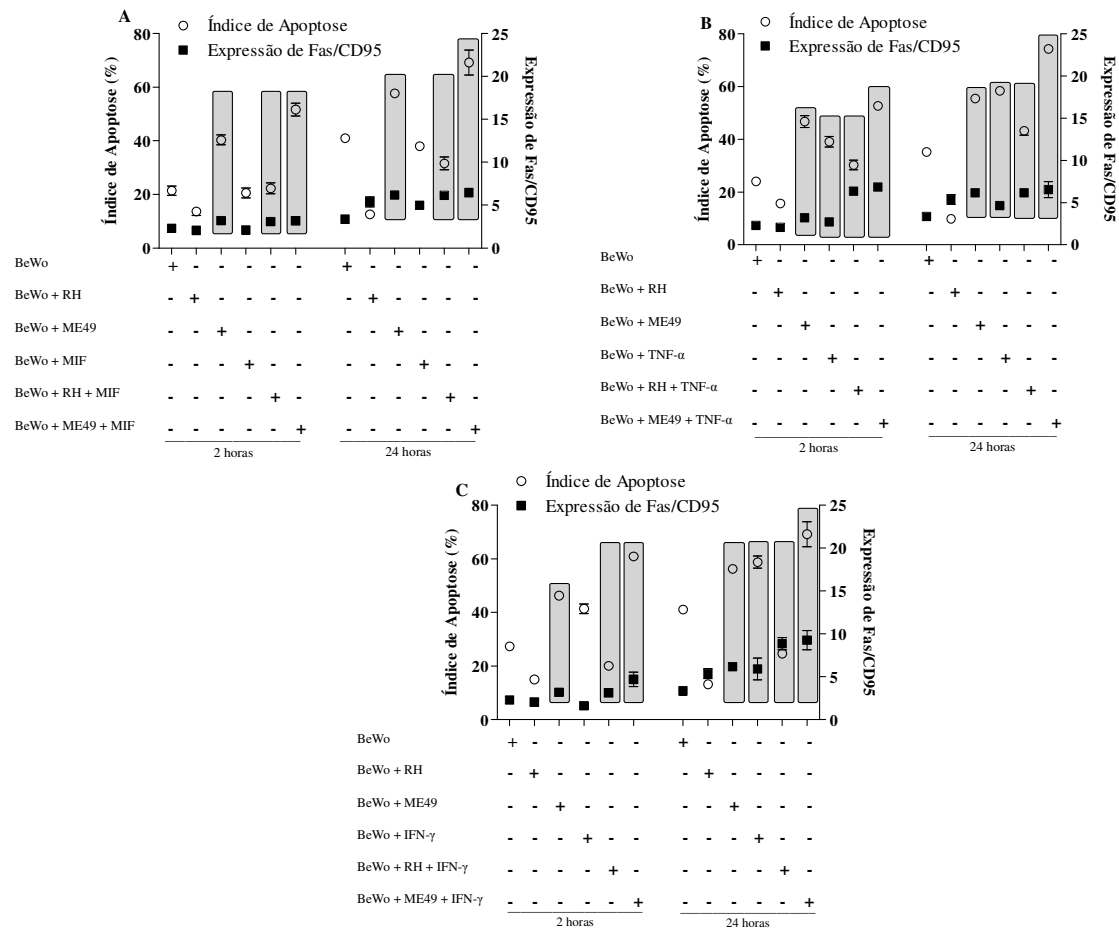
Expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células trofoblásticas BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*. Células BeWo foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes MIF, IFN- γ , TNF- α , IL-6, TGF- β 1 ou IL-10 – 15ng/ml – por 24 horas, infectadas por três horas e novamente tratadas com as citocinas mencionadas acima por 2 horas. Células BeWo foram marcadas com anti-CD95/FITC ou incubadas com IgG irrelevante/FITC e analisadas por citometria de fluxo (A). A análise quantitativa da expressão de Fas/CD95 (B) está representada como a média \pm SEM de dois experimentos independentes em triplicata e analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Foram observadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) após a comparação entre as condições experimentais e os respectivos controles (*), entre as condições tratadas com as citocinas e as não tratadas (#) e entre as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (•).

Figura 6



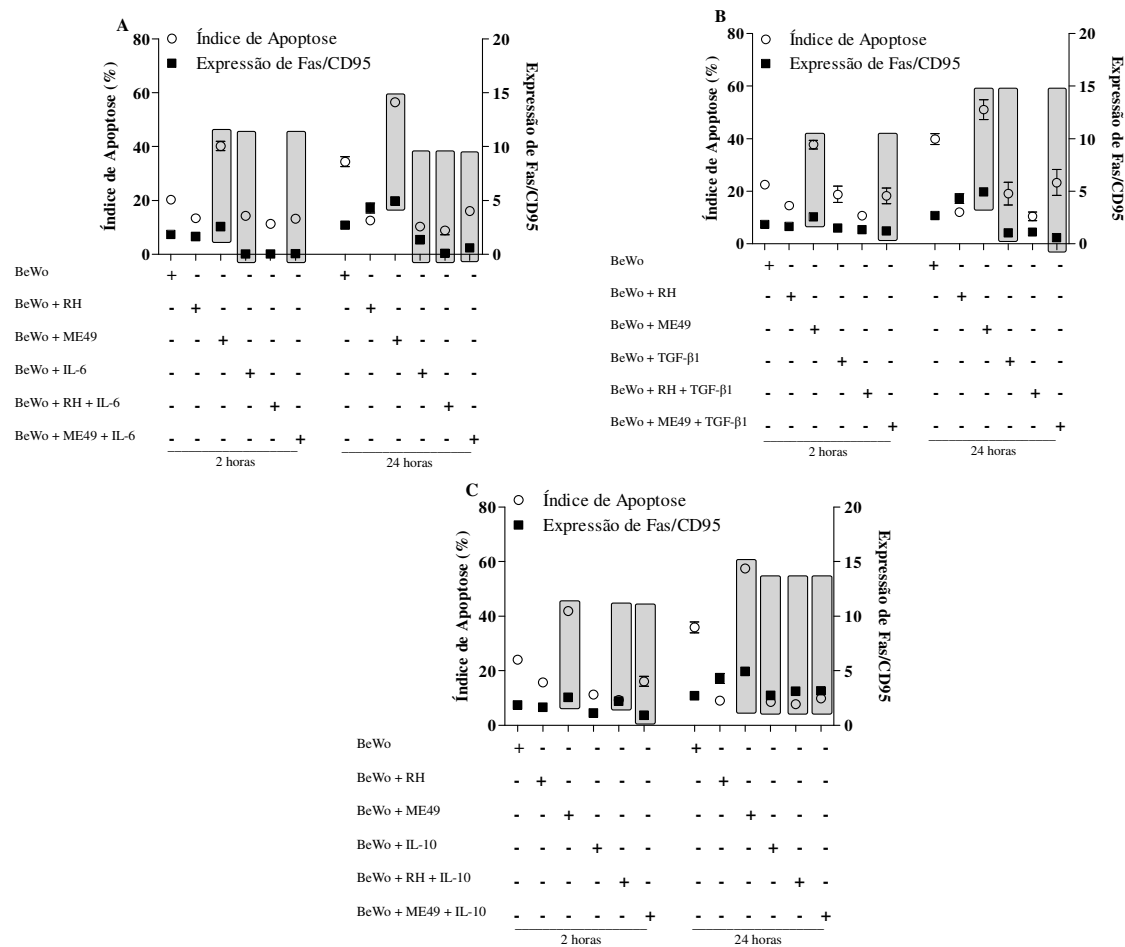
Expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células trofoblásticas BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*. Células BeWo foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes MIF, IFN- γ , TNF- α , IL-6, TGF- β 1 ou IL-10 – 15ng/ml – por 24 horas, infectadas por três horas e novamente tratadas com as citocinas mencionadas acima por 24 horas. Células BeWo foram marcadas com anti-CD95/FITC ou incubadas com IgG irrelevante/FITC e analisadas por citometria de fluxo (A). A análise quantitativa da expressão de Fas/CD95 (B) está representada como a média \pm SEM de dois experimentos independentes em triplicata e analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Foram observadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) após a comparação entre as condições experimentais e os respectivos controles (*), entre as condições tratadas com as citocinas e as não tratadas (#) e entre as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (•).

Figura 7

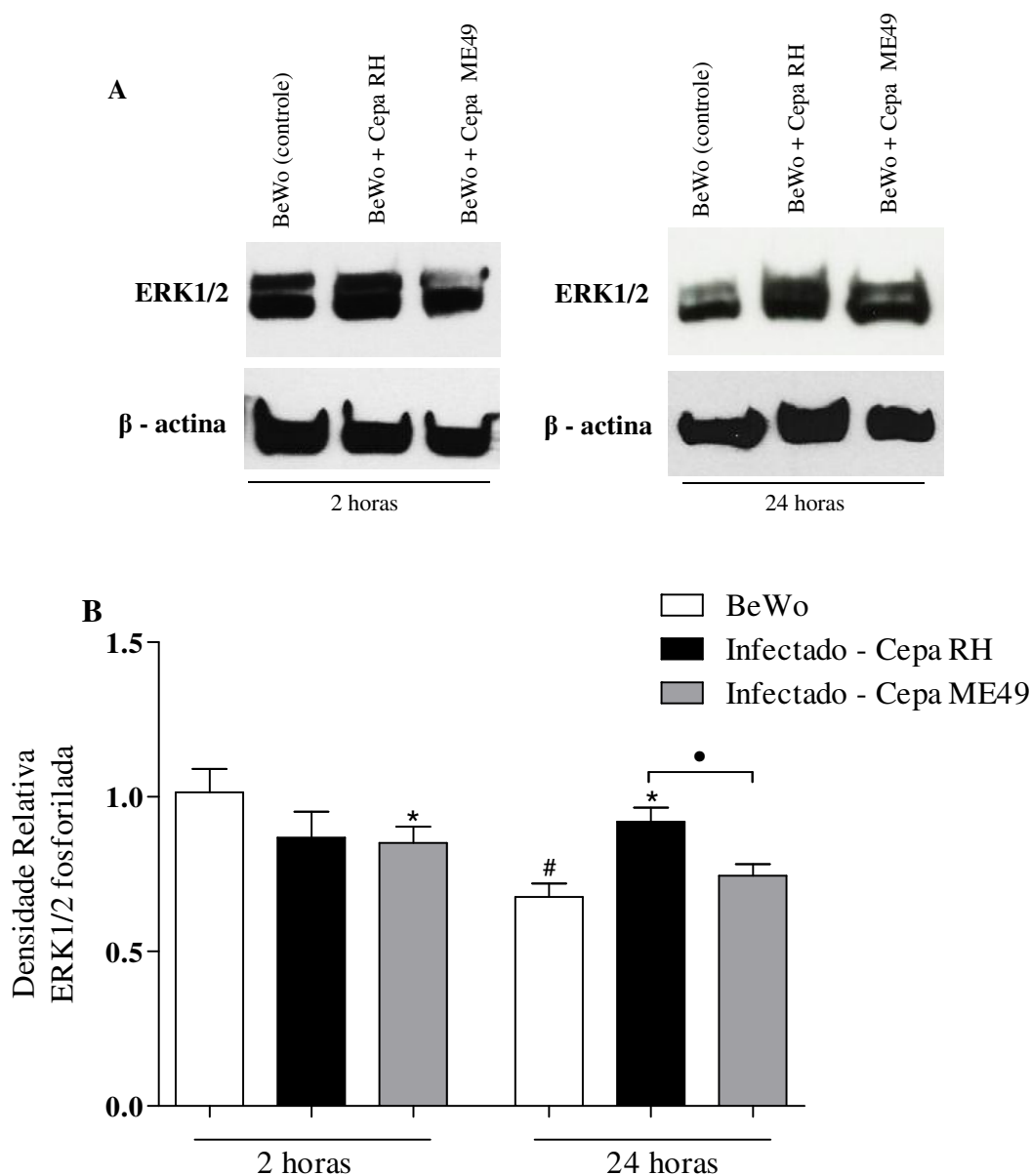


Associação entre o índice de apoptose e expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células trofoblásticas BeWo. As Células foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes MIF (A), IFN- γ (B) ou TNF- α (C) – 15ng/ml – por 24 horas, infectadas com as cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*, por três horas e novamente tratadas com as citocinas mencionadas acima por 2 e 24 horas. Os retângulos em cinza indicam as condições em que observou-se associação entre o índice de apoptose e expressão do receptor Fas/CD95.

Figura 8

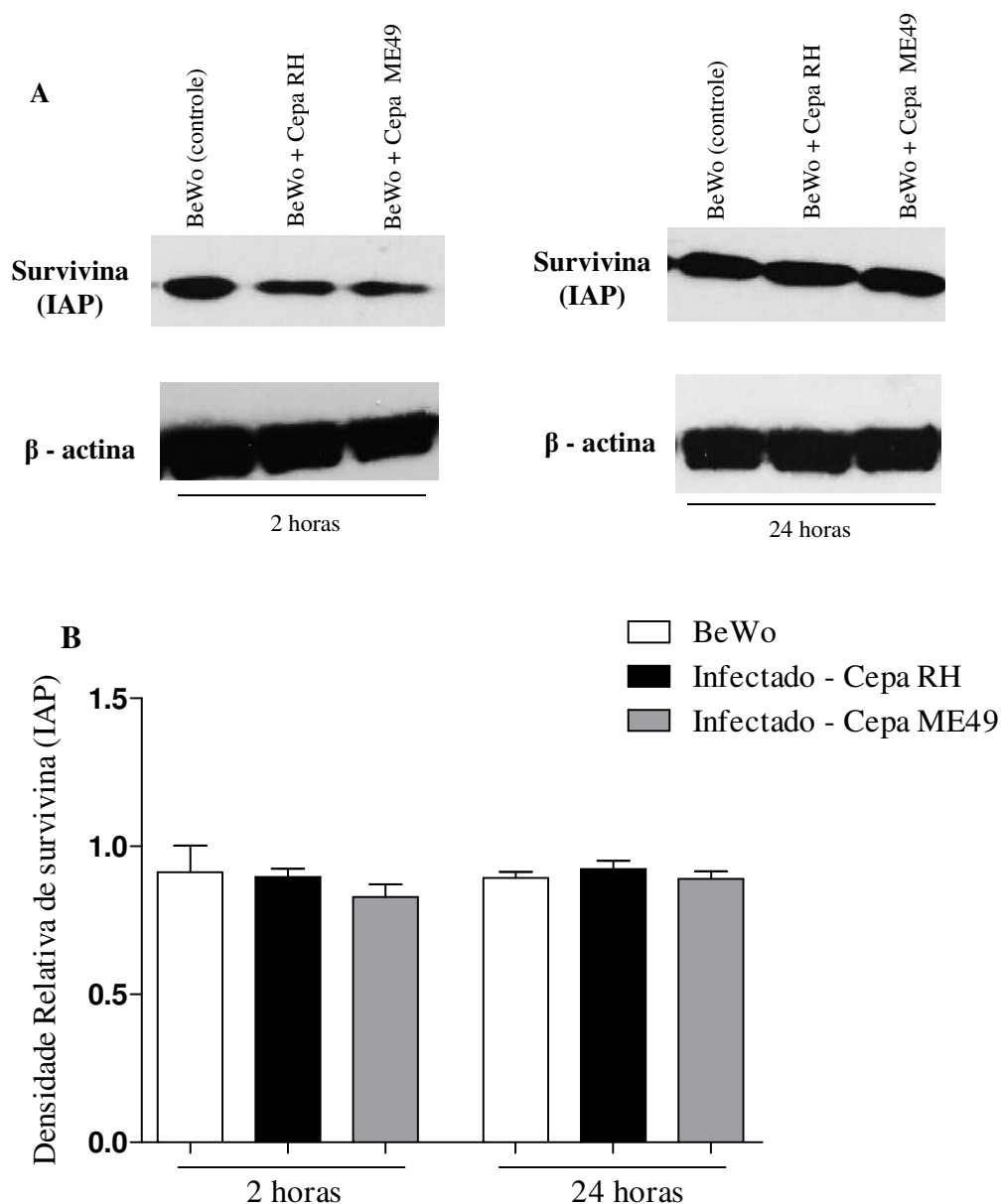


Associação entre o índice de apoptose e expressão do receptor de morte Fas/CD95 em células trofoblásticas BeWo. As Células foram pré-tratadas com as citocinas recombinantes IL-6 (A), IL-10 (B) ou TGF-β1 (C) – 15ng/ml – por 24 horas, infectadas com as cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*, por três horas e novamente tratadas com as citocinas mencionadas acima por 2 e 24 horas. Os retângulos em cinza indicam as condições em que observou-se associação entre o índice de apoptose e expressão do receptor Fas/CD95.

Figura 9

Fosforilação de ERK1/2 em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*. Após 2 e 24 horas de infecção as células foram lisadas em tampão, as proteínas totais foram mensuradas por Bradford e 60µg destas proteínas foram submetidas a técnica de Western blotting para detecção de ERK1/2 e β-actina. (A) Figura representativa de células BeWo mostrando bandas específicas para ERK1/2 e β-actina. (B) Análise por densitometria mostrando a densidade relativa de ERK1/2 obtida pela razão entre as bandas de ERK1/2 e β-actina em células BeWo infectadas e não infectadas. Os dados foram expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por One-Way ANOVA não paramétrico com pós-teste de Kruskal Wallis. Foram observadas diferenças estatísticas após a comparação entre o controle e células infectadas (*), entre as cepas RH e ME49 de *T. gondii* (•) e entre os horários de 2 e 24 horas (#).

Figura 10



Expressão de survivina (IAP) em células BeWo infectadas com as cepas RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii*. Após 2 e 24 horas de infecção as células foram lisadas em tampão, as proteínas totais foram mensuradas por Bradford e 60µg destas proteínas foram submetidas a Western blotting para detecção de survivina (IAP) e β-actina. (A) Figura representativa de células BeWo mostrando bandas específicas para survivina (IAP) e β-actina. (B) Análise por densitometria mostrando a densidade relativa de survivina (IAP) obtida pela razão entre as bandas de survivina (IAP) e β-actina em células BeWo infectadas e não infectadas. Os dados foram expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por One-Way ANOVA não paramétrico com pós-teste de Kruskal Wallis.

9. Referências Bibliográficas

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse of primary infection. **Infect. Immun.**, United States, v. 72, n. 3, p. 1397–401, Mar., 2004.

AGRAWAL, V.; HIRSCH, E. Intrauterine infection and preterm labor. **Semin Fetal Neonatal Med.**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 12-19, Feb., 2012.

AJZEMBERG, D.; YEAR, H.; MARTY, P.; PARIS, L.; DALLE, F.; MENOTTI, J.; AUBERT, D.; FRANCK, J.; BESSIÈRES, M.; QUINIO, D.; PALLOUX, H.; ELHAES, L.; DESBOIS, N.; THLLIEZ, P.; ROBERT-GANGNEUX, F.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; PUJOL, S.; RABODONIRINA, M.; BOUGNOUX, M.; CUISENIER, B.; DUHAMEL, C.; DOUNG, T. H.; FILISETTI, D.; FLORI, P.; GAY-ANDRIEU, F.; PRATLONG, F.; NEVEZ, G.; TOTET, A.; CARME, B.; BONNABAU, H.; DARDÉ, M.; VILLENA, I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **J Infect Dis.**, Chicago, v. 199, n. 8, p. 1155–1167, Apr., 2009.

ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; CASTRO, A. S.; GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo Trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, England, v. 30, p. 785–791, Jul., 2009.

AOKI MDEL, P.; CANO, R.C.; PELLEGRINI, A.V.; TANOS, T.; GUINAZU, N.L.; COSO, O.A.; GEA, S. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. **Microbes Infect.**, France, v. 8, n. 7, p. 1723-1731, Jun., 2006.

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

ASCHKENAZI, S.; STRASZEWSKI, S.; VERWER, K.M.A.; FOELLMER, H.; RUTHERFORD, T.; MOR, G. Differential regulation and function of the Fas/FasL ligand system in human trophoblast cells. **Biol Reprod.**, United States, v. 66, n. 6, p. 1853-1861, Jun., 2002.

BAI, L.; YU, Z.; WANG, C.; QIAN, G.; WANG, G. Dual role of TGF- β 1 on Fas-induced apoptosis in lung epithelial cells. **Respir Physiol Neurobiol.**, Netherlands, v. 177, n. 3, p. 241-246, Aug., 2011.

BANNAI, H.; NISHIKAWA, Y.; MATSUO, T.; KAWASE, O.; WATANABE, J.; SUGIMOTO, C.; XUAN, X. Programmed cell death 5 from *Toxoplasma gondii*: A secreted molecule that exerts pro-apoptotic effect on host cells. **Mol Biochem Parasitol.**, Netherlands, v. 159, n. 2, p. 112-120, Jun., 2008.

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

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

BLADER, I.J.; MANGER, I.D.; BOOTHROYD, J.C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 26, p. 24223-24231, Jun., 2001.

BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* - state of the art. **Ann Agric Environ Med.**, Poland, v. 17, n. 2, p. 209-214, Dec., 2010.

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

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L.D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Curr Opin Microbiol.**, England, v. 10, n. 6, p. 582-587, Dec., 2007.

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; JOHNSON, P.F.; DANKERS, E. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B. **J. Immunol.**, United States, v. 167, n. 4, p. 2193–2201, Aug., 2001.

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; PANOPOULOS, A.D.; WATOWICH, S.S.; MURRAY, P.J.; DANKERS, E. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages. **J. Immunol.**, United States, v. 174, n. 6, p. 3148–3152, Mar., 2005.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: A review. **Acta Trop.**, Netherlands, v. 121, n. 2, p. 55-70, Feb., 2011.

CARMEN, J.C.; HARDI, L.; SINAI, A.P. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathways. **Cell Microbiol.**, England, v. 8, n. 2, p. 301-315, Feb., 2006

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. The Differential effect of *Toxoplasma gondii* infection on the stability of BCL2-family members involves multiple activities. **Front Microbiol.**, Switzerland, v. 2, n° 1, p. 1-13, Jan., 2011.

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

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

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol.**, England, v. 10, n. 1, p. 83-89, Feb., 2007.

CHEN, S.; LIU, Y.; SYTWU, H. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. **Clin Dev Immunol.**, Egypt, v. 2012: 258391, 2012.

CHEN, Y.X.; ALLARS, M.; MAITI, K.; ANGELI, G.L.; ABOU-SEIF, C.; SMITH, R.; NICHOLSON, R.C. Factors affecting cytotrophoblast cell viability and differentiation: Evidence of a link between syncytialisation and apoptosis. **Int J Biochem Cell Biol.**, Netherlands, v. 43, n. 5, p. 821–828, May, 2011.

CROCKER, I.P.; COOPER, S.; ONG, S.C.; BAKER, P. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Am J Pathol.**, United States, v.162, n. 2, p. 637–643, Feb., 2003.

CHURCH, H.J.; APLIN, J.D. BeWo choriocarcinoma cells produce laminin 10. **Biochem J.**, England, v. 1, n. 332 (Pt2), p. 491–498, Jun., 1998.

D'ANGELILLO, A.; LUNA, E.; ROMANO, S.; BISOGNI, R.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N.; PORTO, P.; VECCHIO, L.; PETERSEN, E.; ROMANO, M.F. *Toxoplasma gondii* Dense Granule Antigen 1 stimulates apoptosis of monocytes through autocrine TGF- β signaling. **Apoptosis**, United States, v. 16, p. 551-562, Mar., 2011.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; HIPPE, D.; SCHWARZ, R.T.; CARSTEN, G.; LÜDER, K. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. **Apoptosis**, United States, v.12, n. 4, p. 781-790, Apr., 2007.

DICKENS, S.L.; POWLEY, I.R.; HUGHES, M.A.; MACFARLANE, M. The “complexities” of life and death: Death receptor signaling platforms. **Exp Cell Res.**, United States, v. 318, n. 11, p. 1269-1277, Jul., 2012.

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

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

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**, London, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, Sep., 2012.

DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.**, France, v. 14, n. 15, p. 1403-1410, Dec., 2012.

DUPONT, C.D.; CHRISTIAN, D.A.; HUNTER, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.**, Germany, v. 34, n. 6, p. 793–813, Nov., 2012.

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

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. **Public Health.**, v.122, n.4, p. 335-353, Apr., 2008.

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

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A.; Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases versus local immune tolerance. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, v. 26, n. 1, p. 58-85, Jan., 2013.

FAVOLORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI LLIO, C.; LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging**, United States, v. 4, n. 5, p. 330-342, May, 2012.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Inst Super Sanita.**, Roma, v. 40, n. 11, p. 71-80, 2004.

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

FUJITA, K.; TATSUMI, K.; KONDOH, E.; CHIGUSA, Y.; MOGAMI, H.; FUJII, T.; YURA, S.; KAKUI, K.; KONISHI, K.I. Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors. **Placenta**, England, v. 32, n. 10, p. 737-744, Oct., 2011.

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B.; FIRMINO, M.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; PAULESU, R.S.; SANTOS, M.C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol.**, United States, v. 178, n. 6, p. 2792 – 2801, Jun., 2011.

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

GUBBELS, M.J.; DURAISINGH, M.T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 1071-1081, Nov., 2012.

GYRD-HANSEN, M.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. **Nat Rev Cancer.**, England, v. 10, n. 8, p. 561-574, Aug., 2010.

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

HAPPO, L.; STRASSER, A.; CORY, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **J Cell Sci.**, London, v. 125, p. 1081-1087, Mar., 2012.

HARDWICK, J.M.; CHEN, Y.; JONAS, E.A. Multipolar functions of Bcl-2 proteins link energetics to apoptosis. **Trends Cell Biol.**, England, v. 22, n. 6, p. 318-328, Jun., 2012.

HEAZELL, A.E.P.; CROCKER, I.P. Live and let die – regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. **Placenta**, England, v. 29, n. 9, p. 772-783, Sep., 2008.

HIEBERT, P. R.; GRANVILLE, D. J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends in Mol Med.**, England, v. 18, n° 12, p. 732-741, Dec. 2012.

HIPPE, D.; LYTOVCHENKO, O.; SCHMITZ, I.; LUDER, C.G.K. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. **Infect Immun.**, United States, v. 76, n. 7, p. 2905-2912, Jul., 2008.

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

HUNTER, C.A.; SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence factors. **Nat Rev Microbiol.**, London, v. 10, n. 11, p. 766-778, Nov., 2012.

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

HWANG, I.; QUAN, J.H.; AHN, M.; AHMED, H.; CHA, G.; SHIN, D.; LEE, Y. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. **Parasitol Res**, Germany, v. 107, p. 1313-1321, Jul, 2010.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Foodborne toxoplasmosis. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 55, n.6, p. 845-851, Sep., 2012.

KAMIR, D.; ZIEROW, S.; LENG, L.; CHO, Y.; DIAZ, Y.; GRIFFITH, J. A., MCDONALD, C.; MERK, M.; MITCHELL, R.A.; TRENT, J.; CHEN, Y.; KWONG, Y.K.; XIONG, H.; VERMEIRE, J.; CAPPELLO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; WALKER, J.; BERNHAGEN, J.; LOLIS, E.; BUCALA, R. *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. **J Immunol.**, Baltimore, v. 180, n. 12, p. 8250-8261, Jun., 2008.

KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU, C.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Inter J Parasitol.**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 645-655, May., 2011.

KIM, J.; AHN, M.; JUN, H.; JUNG, J.; RYU, J.; MIN, D. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF- κ B activation. **Yonsei Med J.**, Korea, v. 47, n. 6, p. 862-869, Dec., 2006.

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

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic disease: still more questions than answers. **Inter J Parasitol.**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 879-888, Jul., 2010.

LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell Death Differ.**, England, v. 15, n. 9, p. 1339-1349, Sep., 2008.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V.B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol Life Sci.**, Switzerland, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, Jun., 2008.

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

LEE, J.; CHOI, B.; CHO, C.; HILL, J.A.; BACK, K.; KIM, J. Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of Th1 immunity. **Fertil Steril.**, United States, v. 83, n. 4, p. 1047-1049, Apr, 2005.

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

LI, C.F.; GOU, W.L.; LI, X.L.; WANG, S.L.; YANG, T.; CHEN, Q. Reduced expression of survivin, the inhibitor of apoptosis protein correlates with severity of preeclampsia. **Placenta**, England, v. 33, n. 1, p. 47-51, Jan., 2012.

LI, L.W.; SHAO, Z.X.; YAN, J. Change of cytoskeleton and variance of Ca²⁺ in cultured cells during the invasion of *Toxoplasma gondii*. **Zhongguo JiSheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, China, v. 24, n. 4, p. 251–256, Aug., 2006.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: the changinga paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, London, v. 138, p. 1829-1831, Sep., 2011.

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

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

LÜDER, C.G.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol.**, Germany, v. 289, p. 219–237, 2005.

LÜDER, C.G.K.; STANWAY, R.R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V.T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 163-173, Jan., 2009.

LÜDER, C.G.K; CAMPOS-SALINAS, J.; GONZALEZ-REY, E.; ZANDBERGEN, G. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasit Vectors**, London, v. 2, n. 3, p. 1-16, Dec., 2010.

MAUBON, D.; AJZEMBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M.P.; DARDÉ, M.L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 299-303, Jul., 2008.

MELO, M.B.; JENSEN, K.D.C.; SAEIJI, J.P.J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 487-495, Nov., 2011.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; KIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-39, Jan., 2009.

MINEO, J.R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect Immun.**, United States, v. 27, v. 2, p. 283-287. Feb., 1980.

MOLESTINA, R.E.; GUENDY, N.; SINAI, A.P. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. **Cell Microbiol.**, England, v. 10, n. 5, p. 1153-1165, May, 2008.

MOLESTINA, R.E.; PAYNE, M.; COOPENS, I.; SINAI, A.P. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Sci.**, England, v.1, n. 116, p. 4359-4371, Nov., 2003.

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

MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 554-556, Aug., 2008.

NAUGLER, W.E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends Mol Med.**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 109-119, Mar., 2008.

OW, Y.P.; GREEN, D.R.; HAO, Z.; MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat Rev Mol Cel Biol.**, England, v. 9, n. 7, p. 532-542, Jul., 2008.

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

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. **J Parasitol.**, United States, v. 97, n. 4, p. 620-628, Aug., 2011.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal.**, Netherlands, v.12, n.3, p. 215-223, Jun., 2007.

QUAN, J.; CHA, G.; ZHOU, W.; CHU, J.; NISHIKAWA, Y.; LEE, Y. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent bad phosphorylation in *Toxoplasma gondii*-mediated inhibition of host cell apoptosis. **Exp Parasitol.**, United States, v. 133, n. 4, p. 462-471, Apr., 2013.

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

REN, L.; LIU, Y.; ZHOU, W.; ZHANG, Y. Trophoblast-derived chemokine CXCL12 promotes CXCR4 expression and invasion of human first-trimester decidual stromal cells. **Human Reprod.**, England, v. 27, n. 2, p. 366-374, Nov., 2012.

ROBBEN, P.A.; MORDUE, D.G.; TRUSCOTT, S.M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **J Immunol.**, United States, v. 172, n. 6, p. 3686–3694, Mar., 2004.

ROBBINS, J.R.; ZELDOVICH, V.B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J.C.; BAKARDJIEV, A.I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, United States, v. 80, n. 1, p. 418–428, Jan., 2011.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; OUAISSI, A.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. **Cell Microbiol.**, England, v. 14, n° 3, p. 325-333, Mar. 2012.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod Toxicol.**, United States, v. 21, n. 4, p. 458-472, May, 2006.

RUPINDER, S.K.; GURPREET, A.K.; MANJEET, S. Cell suicide and caspases. **Vascul Pharmacol.**, United States, v. 46, n. 6, p. 383-393, Jun, 2007.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 25, n. 2, p. 264-296, Apr., 2012.

SAEJI, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 477-481, Oct., 2005.

SANECKA, A.; FRICKEL, E.M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, Austin, v. 3, n. 7, p. 678-689, Nov., 2012.

SANTOS, T. A.; PORTES, J. DE A.; DAMASCENO-SÁ, J. C.; CALDAS, L. A.; SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. **PLoS One.**, United States, v. 6, nº 11, e27867, Nov., 2011.

SENEGAS, A.; VILLARD, O.; NEUVILLE, A.; MARCELLIN, L.; PFAFF, A.W.; STEINMETZ, T.; MOUSLI, M.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon- γ -induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofetal interface. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 481-487, Mar., 2009.

SHARP, A.N.; HEAZELL, A.E.; CROCKER, I.P.; MOR, G. Placental apoptosis in health and disease. **Am J Reprod Immunol.**, New York, v. 64, n. 3, p. 159-169, Sep., 2010.

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

SIBLEY, L.D.; KHAN, A.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, London, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, Sep., 2009.

SIBLEY, L.D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Curr Opin Biotechnol.**, London, v. 21, n. 5, p. 592-598, Oct., 2010.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res.**, Germany, v. 105, nº 4, p. 893-898, Oct. 2009.

SINAI, A.P.; PAYNE, T.M.; CARMEN, J.C.; HARDI, L.; WATSON, S.J.; MOLESTINA, R.E. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 381-391, Mar, 2004.

SINAI, A.P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Subcell Biochem.**, England, v. 47, p. 155-164, Jul., 2008.

SONG, K.J.; AHN, H.; NAM, H. Anti-apoptotic effects of SERPIN B3 and B4 via STAT6 activation in macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. **Koren J Parasitol.**, Korea, v. 50, n. 1, p. 1-6, Mar., 2012.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. **Sci Med.**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 131–143, 2010.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J.**, England, v. 30, n. 18, p. 3667–3683, Aug., 2011.

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M.E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A.H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiol.**, Amsterdam, v. 217, n. 1, p. 28–36, Jan., 2012.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Washington, v. 109, n. 15, p. 5844–5849, Apr., 2012.

SULLIVAN, W.J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiol Rev.**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 717–733, Oct., 2011.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, England, v. 9, n. 3, p. 231–241, Mar, 2008.

TU, B.; DU, L.; FAN, Q.; TANG, Z.; TANG, T. STAT 3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 325, n. 1, p. 80–88, Dec., 2012.

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

VELJKOVIC-VUJAKLIJA, D.; SUCIC, S.; GULIC, T.; DOMINOVIC, M.; RUKAVINA, D. Cell death mechanisms at the maternal-fetal interface: insights into the role of granulysin. **Clin Dev Immunol.**, v. 2012, ID: 180272, 2012.

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDÈ, M.; PINON, J.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 160–162, Apr., 2004.

VUTOVA, P.; WIRTH, M.; HIPPE, D.; GROSS, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, I.; LÜDER, C.G.K. *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. **Cell Microbiol.**, England, v.9, n. 6, p. 1556-1570, Jun., 2007.

YAMADA, T.; TOMITA, T.; WEISS, L.M.; ORLOFSKY, A. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cell. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 595-607, May, 2011.

YAP, G.S.; SHAW, M.H.; LING, Y.; SHER, A. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. **Microbes Infect.**, France, v. 8, p. 1174–1178, Jan, 2006.

YAROVINSKY, F.; SHER, A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 715-724, Jun., 2011.

ZHANG, L.; JIA, L.; CUI, S.; SHI, Y.; CHANG, A.; WANG, P.; ZHANG, Z. AP-2 α -dependent regulation of Bcl-2/Bax expression affects apoptosis in the trophoblast. **J Mol Histol.**, Netherlands, v. 43, n. 6, p. 681-698, Dec., 2012.

ZHAO, M.; ZHANG, R.; XU, X.; LIU, Y.; ZHANG, H.; ZHAI, X.; HU, X. IL-10 reduces levels of apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected trophoblasts. **PLoS One.**, United States, v. 8, n. 3, e56455, Feb., 2013.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131
 e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 207/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO
 CEP/UFU 091/09

Projeto Pesquisa: Influência das cepas RH e ME49 de *Toxoplasma gondii* nas vias de sinalização intracelular que medeiam os processos de apoptose em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e em tecidos placentários de camundongos.

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

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

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

O CEP/UFU lembra que:

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

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

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

Data de entrega do relatório parcial: Julho de 2010.

Data de entrega de relatório parcial: Julho de 2011.

Data de entrega de relatório parcial: Julho de 2012.

Data de entrega de relatório final: Julho de 2013.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 05 de junho de 2009.

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

Orientações ao pesquisador

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