

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CAMILLA MANZAN MARTINS

**Os processos de endoreduplicação e invasão de células trofoblásticas
extravilosas humanas (linhagem HTR-8/SVneo) são influenciados pela
presença do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii***

UBERLÂNDIA

2016

CAMILLA MANZAN MARTINS

**Os processos de endoreduplicação e invasão de células trofoblásticas
extravilosas humanas (linhagem HTR-8/SVneo) são influenciados pela
presença do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eloisa Amália Vieira Ferro

UBERLÂNDIA

2016

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

M386p
2016

Martins, Camilla Manzan, 1988

Os Processos de endoreduplicação e invasão de células trofoblásticas extravilosas humanas (linhagem HTR-8/SVneo) são influenciados pela presença do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* / Camilla Manzan Martins. - 2016.

67 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Antígenos - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Dedico este trabalho...

...aos meus pais **Maria Helena** e **Oscar**, que sempre me incentivaram, me apoiaram e sempre disseram que o conhecimento seria uma das maiores riquezas que poderiam me dar. Foi com eles que aprendi o valor da vida, do caráter, da honestidade e da vontade de batalhar pelos nossos sonhos.

Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Amo muito vocês...

Agradecimentos

Ao final de mais uma etapa, com a sensação de dever cumprido e com a certeza de que aqui dei o meu melhor, me esforcei, errei, acertei, aprendi. Cresci. Um crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que me proporcionou!

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para minha caminhada até aqui!

Um agradecimento especial à minha orientadora Eloisa por abrir as portas do seu laboratório e me aceitar na sua equipe. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio, pela confiança e pelas oportunidades. Foi uma caminhada de muito aprendizado e crescimento! Você me mostrou a vontade pelo ensinar, foi você Eloisa, uma das minhas melhores professoras na graduação e também na pós-graduação. Será sempre meu exemplo! Meu eterno agradecimento e admiração!!!

Obrigada Dr. José Roberto Mineo por ter concedido seu laboratório e equipamentos para realização de parte deste trabalho.

Obrigada Bellisa, por ser esse exemplo de pessoa e de profissional. Obrigada Bê, pelo apoio em todos os momentos que precisei, pela sua dedicação e suas sábias opiniões e conselhos. Você com esse jeito calmo e de coração enorme sabe quando elogiar e quando “puxar a orelha”. Sou imensamente grata por tudo que fez por mim. Te admiro muito!

Obrigada Pâmela... Pamelitcha, por estar sempre ao meu lado, por me ensinar sempre de maneira sensato, me fazendo entender, aprender e crescer, tanto profissional como pessoalmente. Agradeço imensamente pelo apoio!

Obrigada Francesca, pelos ensinamentos e oportunidades vivenciadas. Agradeço você e sua família pela recepção em Siena, por ter aberto as portas de sua casa me recebendo com tanto carinho e atenção!

Obrigada Caroline, minha prima querida, pela ajuda e pelo socorro sempre que te pedi, sempre prestativa, mesmo nas horas de almoço, no meio de experimentos, sempre que via uma mensagem minha no celular, já sabia, eu estava precisando de ajuda na revelação do *blotting* e respondia “vem... já liguei o ar”. Sou infinitamente grata por tudo que fez por mim, pelos conselhos, pelas experiências vividas, pelo seu exemplo de profissional dedicada. Obrigada por fazer parte dessa história!

Obrigada minhas queridas amigas Thádía e Francielle, pelo enorme carinho, pelos conselhos e opiniões, pelos desabafos, pelos momentos de alegria e descontração, pelas horas de almoço intermináveis... pela convivência diária. Vocês me mostraram sempre os fatos por outro ponto de vista, me deram apoio e incentivo. Agradeço eternamente a amizade!

Obrigada Angel, por ser este exemplo para todos nós, pois mesmo longe está sempre presente no dia a dia, “não, melhor não fazemos assim, a Angel ensinou que...”, ou “A Angel viu que assim é melhor de se fazer...”. Sempre que vem ao laboratório, já sabemos, o auto astral, a alegria e a positividade é presença garantida. Mesmo com pouco tempo de convivência aprendi muito com você Angel! Muito obrigada!

Obrigada Pri, pelos ensinamentos, pelas “broncas” que me fizeram aprender e crescer! Você sempre presente no laboratório me auxiliando em vários momentos e sendo sempre muito prestativa e criteriosa. Sou muito grata pelo que aprendi com você! Obrigada!!!

Obrigada Rafaela, Fernanda, Andressinha, Mayara, Carol, Glina, Juliana, Paula, Ariane, Lara e Mateus pelo acolhimento assim que entrei no laboratório, pela amizade, pela conviência, por toda a ajuda sempre que precisei, pelos conversas e risadas, pelo apoio e conselhos e acima de tudo, por serem responsáveis por tudo que aprendi e cresci nesta caminhada. Obrigada!!!

Obrigada meus amigos do mestrado: Pedro, Madjanía, Bruno, Andrielle, Breno, Marcos, Kellen pelas experiências vivenciadas, pelas alegrias e dificuldades compartilhadas e pelos momentos de descontração.

Obrigada Vinícius, meu querido, meu companheiro, por todos os conselhos e apoio nos momentos difíceis e alegres, por estar sempre ao meu lado! Você é meu porto seguro, minha motivação e inspiração... Você foi parte fundamental nessa minha conquista! Agradeço à Deus por ter te colocado na minha vida! Muito brigada!

Obrigada meus irmãos Gustavo e Laura por existirem em minha vida, alegrando meus dias, me dando força e motivação. Amo vocês! Gustavo e minha cunhada Sandra, obrigada por terem nos dado a Nicole, essa sobrinha linda, que é motivo de tanta felicidade!

Obrigada Lionizia pelo incentivo e pela compreensão, pelas opiniões e conselhos, pelos cappuccinos deliciosos nos lanches da tarde! Obrigada por estar sempre presente!

Obrigada Maria Helena, minha sogra, pelo apoio nas horas de estudo, pelos conselhos e pela enorme motivação e exemplo de coragem e dedicação!

CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro, a FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

*“Nunca o homem inventará nada mais
simples nem mais belo do que uma
manifestação da natureza.
Dada a causa, a natureza produz o
efeito no modo mais breve em que
pode ser produzido”.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar diversos vertebrados, inclusive o homem. Na transmissão vertical da toxoplasmose, o parasita ultrapassa a barreira placentária, podendo causar consequências graves ao feto, como complicações no sistema nervoso central, toxoplasmose ocular ou mesmo aborto. A placenta, fundamental para a gestação, fornece nutrientes ao embrião e propicia condições favoráveis à implantação. Durante esse processo, eventos como a invasão e a migração de células trofoblásticas extravilosas são fundamentais para uma adequada placentação e sucesso gestacional. O controle da capacidade invasiva destas células é regulado por mecanismos intrínsecos, como a endoreduplicação do material genético. Assim, a inadequada migração e invasão de células trofoblásticas extravilosas estão associadas à patologias relacionadas à gestação. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do Antígeno Solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg) nos processos de migração, invasão e endoreduplicação das células trofoblásticas extravilosas HTR-8/SVneo. Inicialmente as células HTR-8/SVneo foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Os processos de migração e invasão foram realizados por meio de *Transwell* e Matrigel, respectivamente. A endoreduplicação e as metaloproteinases foram avaliadas utilizando a técnica de *Western Blotting* por meio da expressão da proteína p57 e das MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Células trofoblásticas extravilosas HTR-8/SVneo tratadas com STAg apresentaram menor expressão intracelular da proteína p57 em células trofoblásticas tratadas, quando comparada às células sem tratamento. Notou-se também, uma maior capacidade invasiva quando comparadas ao grupo controle, bem como uma maior expressão da metaloproteinase 2. O STAg influenciou a diminuição da expressão da proteína p57 e a diminuição dos processos de endoreduplicação e, muito provavelmente, o número de células gigantes, favorecendo a capacidade invasiva das células trofoblásticas extravilosas, por meio da MMP-2.

Palavras-chave: p57. STAg. HTR-8.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite able to infect many vertebrates, including the humans. In the vertical transmission of toxoplasmosis, the parasite overcomes the placental barrier and may cause serious consequences to the fetus, such central nervous system complications, ocular toxoplasmosis or even miscarriage. Placenta, essential for pregnancy, provides nutrients to the embryo and favors conditions for implantation. During this process, events such as invasion and migration of extravillous trophoblast cells are essential to induce placentation and pregnancy success. The control of these cells invasiveness is regulated by intrinsic mechanisms such as genetic material endoreduplication. Thus, inadequate migration and invasion of extravillous trophoblast cells are associated with pregnancy disorders. Thus, this study aimed to evaluate if antigen soluble *Toxoplasma gondii* (STAg) could influence in the migration, invasion and endoreduplication processes of HTR-8/SVneo extravillous trophoblast cells. Initially, HTR-8/SVneo cells were cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Migration and invasion assays were performed by Transwell and Matrigel, respectively. Endoreduplication and metalloproteinases were evaluated using the Western Blotting technique by p57 and MMP 2/9 protein expression, respectively. Extravillous trophoblast cells HTR-8/SVneo treated with STAg decreased p57 protein intracellular expression in trophoblast cells treated compared to untreated cells. It was also observed an increase in the invasiveness of these cells when compared to the control group, as well as increased expression of metalloproteinase 2. STAg influences in the p57 protein expression and the decrease in this protein levels reduced the endoreduplication processes and either the number of giant cells, favoring the invasiveness of extravillous trophoblast cells by MMP-2.

Keywords: p57. STAg. HTR-8

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag T: antígeno T

CDK: quinase dependentes de ciclinas

CDKI: inibidores de cinase dependentes de ciclinas

Células NK: célula “natural killer”

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético

EGF: fator de crescimento epidérmico

ERK: quinase regulada por sinais extracelulares

FGF4: fator de crescimento de fibroblastos 4

ICAM-I: molécula de adesão intercelular do tipo 1

IFN- γ : interferon gama

IL-10: interleucina 10

MIF: fator de inibição da migração de macrófagos

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinase de matriz

PGE₂: prostaglandina E₂

PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoreto

PVDF: “polyvinylidene fluoride”

SBF: soro fetal bovino

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida para eletroforese

STAg: antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*

STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição

SV40: vírus símio 40

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase

TGF- β : fator beta transformador do crescimento

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Placentação.....	12
1.1.1 Implantação e formação da placenta.....	12
1.1.2 As metaloproteinases no processo de invasão.....	15
1.1.3 Endoreduplicação	17
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.2.1 Caracterização, epidemiologia e ciclo biológico.....	19
1.2.2 Toxoplasmose congênita e a resposta imune durante a gestação	25
1.3 Linhagem celular	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVO	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Manutenção de células HTR-8/SVneo e BeWo em cultura	32
4.2 Manutenção de <i>T. gondii</i> em cultura e produção de antígeno solúvel de taquizoítos (STAg)	33
4.3 Tratamento das células HTR-8/SVneo com STAg	33
4.4 Liofilização do sobrenadante de células HTR-8/SVneo tratadas com STAg..	34
4.5 Ensaio de invasão por Matrigel e migração por <i>Transwell</i>	34
4.6 <i>Western Blotting</i>	35
4.7 Normas de biossegurança	37
4.8 Análise Estatística	37
5. RESULTADOS	38
5.1 O estímulo com STAg aumentou a capacidade invasiva de células HTR- 8/SVneo	38
5.2 O estímulo com STAg alterou a expressão da metaloproteinase MMP-2 em células HTR-8/SVneo.....	38
5.3 O estímulo com STAg reduziu a expressão da proteína p57 em células HTR-8/SVneo.....	39
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	45
8. FIGURAS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. Introdução

1.1. Placentação

1.1.1. Implantação e formação da placenta

O processo de implantação embrionária é altamente dinâmico e invasivo, o qual se inicia com a adesão da blástula ao epitélio uterino e diferenciação das células trofoblásticas (BURTON; JAUNIAUX, 2015), que posteriormente se alojam no endométrio favorecendo o estabelecimento de um microambiente propício para a formação e crescimento do embrião (CHAMLEY et al, 2014). Durante a implantação células estromais da decídua sofrem modificações para garantir o sucesso da gestação, processo conhecido como decidualização. Tais alterações são constituídas por transformações das glândulas uterinas, influxos de células “natural killer” (células NK) especializadas, bem como o remodelamento das artérias espiraladas (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016).

Células trofoblásticas são consideradas o principal grupo celular responsável pelo processo de implantação do embrião e formação da parte fetal da placenta, bem como de nutrição e regulação hormonal (FERRO; BEVILACQUA, 1994; FERRO, 2000; CHAMLEY et al, 2014; MAYHEW, 2014). Os trofoblastos são conhecidos como uma população celular progenitora denominada citotrofoblastos, os quais possuem um alto potencial proliferativo formando colunas celulares que sustentam os vilos placentários (GOLDMAN-WOHL; YAGEL, 2002; KNÖFLER, 2010; ILEKIS et al., 2016). Durante a implantação do blastocisto, as células do citotrofoblasto se diferenciam em duas grandes subpopulações: sinciotrofoblasto, células multinucleadas responsáveis pelo transporte de nutrientes, pela produção de alguns hormônios e pelo revestimento dos vilos flutuantes; e trofoblastos extravilosos (TEV), responsáveis pelos processos de invasão na decídua materna e remodelamento das artérias espiraladas (GOLDMAN-WOHL; YAGEL, 2002; KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; BALL et al 2006). Dessa forma, o sucesso da implantação se

deve principalmente a interações entre a mucosa uterina e as células trofoblásticas do blastocisto maduro (LOKE; KING; BURROWS, 1995; SALAMONE et al., 2012).

Os trofoblastos extravilosos migram dos vilos de ancoragem em direção à decídua e artérias espiraladas adquirindo um potencial invasivo/proliferativo, portanto se diferenciam em trofoblasto extraviloso intersticial (TEVi) e trofoblasto extraviloso endovascular (TEVe) (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Os trofoblastos extravilosos intersticiais se relacionam diretamente com as células deciduais, proliferam, invadem (BIONDI et al., 2006) e em alguns casos se tornam células poliploides ou células gigantes (ILEKIS et al., 2016). Já os trofoblastos extravilosos endovasculares tem como alvo os vasos sanguíneos, onde se intercalam com as células endoteliais e remodelam as artérias espiraladas, aumentando o diâmetro do vaso e diminuindo a resistência de fluxo sanguíneo de forma a permitir um maior fluxo de sangue para o espaço intervilloso. Como consequência haverá uma maior abundância de nutrientes na interface materno-fetal (REDMAN; SARGENT, 2010; CHAMLEY et al., 2014; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

A diferenciação e a capacidade invasiva dos trofoblastos extravilosos são reguladas temporal e espacialmente tanto por outras subpopulações trofoblásticas quanto por fatores deciduais; assim a invasão intersticial do trofoblasto é controlada para que não ultrapasse os limites da decídua (LALA; HAMILTON, 1996; BISCHOF; MEISSER; CAMPANA, 2000; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Dentre esses fatores, níveis de oxigênio e moléculas liberadas por outras subpopulações celulares são capazes de regular a proliferação, migração e invasão desses trofoblastos extravilosos (CHAKRABORTY et al., 2002, 2003).

Alteração no processo de invasão ou no remodelamento das artérias espiraladas pode ter consequências graves para a gestante e para o feto, uma vez que são necessárias ações coordenadas e precisas para uma placentação adequada (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Uma possível redução da capacidade invasiva trofoblástica pode levar a complicações

gestacionais como pré-eclâmpsia ou restrição do crescimento intrauterino (JI et al., 2013). A principal característica da pré-eclâmpsia é o remodelamento incompleto das artérias espiraladas o que resulta em um quadro de hipoperfusão e uma consequente diminuição de nutrientes para o feto (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Por outro lado, um excessivo processo de invasão pode estar relacionado ao desenvolvimento de placenta acreta, quando os trofoblastos atingem a camada superficial do miométrio, ou percreta, quando a placenta ultrapassa o miométrio atingindo o peritônio visceral (CHAKRABORTY et al., 2002; BIONDI et al 2006; TANTBIROJN; CRUM; PARAST, 2008).

Finalmente, a placenta é um órgão fundamental para a gestação, de forma a propiciar suporte para o crescimento e desenvolvimento fetal durante o processo gestacional (LOKE; KING; BURROWS, 1995; SIMMONS; CROSS, 2005), fornecendo nutrientes, oxigênio e proteção (POLACHEK et al., 2010; KAY; NELSON; WANG, 2011; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). Além disso, a placenta é um órgão chave na relação materno-fetal, uma vez que possibilita a formação de um microambiente de tolerância imunológica necessária para a gestação, bem como uma proteção ao feto contra agentes infecciosos. (ROBERT-GANGNEUX et al, 2011; ZELDOVICH; BAKARDJIEV, 2012). A figura que se segue mostra os diferentes compartimentos do microambiente placentário.

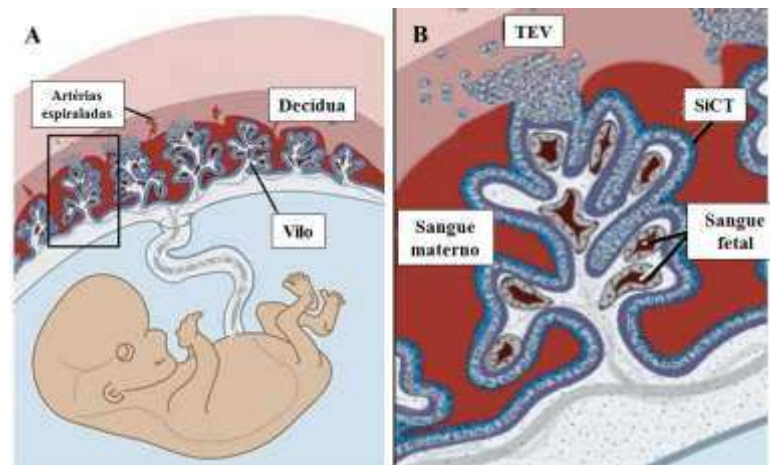


Figura 1. Estrutura da placenta humana. (A) Na gestação a camada uterina se diferencia em decídua. Os trofoblastos originam os vilos coriônicos. Trofoblastos extravilosos remodelam as artérias espiraladas para o aumento do fluxo sanguíneo. (B) Estrutura do vilão coriônico em maior aumento. No espaço intervilloso, o sangue materno banha os vilos, formados na camada interna pelos citotrofoblastos e na parte externa pelos sincitiotrofoblasto (SiCT). Os citotrofoblastos quando em contato com a decídua se diferenciam em trofoblastos extravilosos (TEV), que invadem a camada uterina ancorando os vilos. (Adaptada: ZELDOVICH; BAKARDJIEV, 2012).

Na placenta humana, células trofoblásticas se encontram em contato direto com o sangue materno, devido aos mecanismos de placentação. Este órgão é dividido basicamente em duas regiões: a placa coriônica (parte fetal) e a decídua basal (parte materna). Entre elas se encontra o espaço intervilloso, no qual os vilos flutuantes se encontram em íntimo contato com o sangue materno (BENIRSCHKE; KAUFMANN, 2000). Já na mucosa uterina são encontrados os vilos de ancoragem, os quais medeiam a ligação entre a placenta e o endométrio (GOLDMAN-WOHL; YAGEL, 2002; GUDE et al, 2004).

1.1.2. As metaloproteinases no processo de invasão

A capacidade invasiva das células trofoblásticas extravilosas humanas é regulada por fatores derivados das próprias células trofoblásticas e também de células deciduais (SHARMA; GOBOLE; MODI, 2016), as quais podem secretar moléculas que estimulam ou inibem este processo, como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1, IL-6,

IL-11), TGF- β , dentre outros (SIVAK; FINI, 2002; CHAKRABORTY et al., 2003; GORDON et al., 2009; SHARMA; GOBOLE; MODI, 2016). A regulação da invasão se dá também pelo equilíbrio entre as metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs).

As metaloproteinases são pertencentes a uma família de endopeptidases, divididas de acordo com sua estrutura, isto é o sítio catalítico da sua parte ativa (serina/treonina, cisteína, aspártico e metalo) (PARKS; MECHAM, 1998) e o substrato sobre o qual atuam, sendo elas: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metaloproteinases ligada à membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), dentre outras (NABESHIMA et al., 2002; BROOKS; OLLIVIER, 2004; BREJCHOVA et al., 2009). As MMPs são endopeptidases classificadas como metalo por serem dependentes de zinco, porém são secretadas na sua forma inativa, pró-MMP, e ativadas somente no meio extracelular. As collagenases são capazes de degradar colágeno tipo I, II e III, ao passo que as gelatinases degradam fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, V e VII (SIVAK; FINI, 2002; BREJCHOVA et al., 2009).

As metaloproteinases quando secretadas pelos trofoblastos extravilosos são capazes de degradar e remodelar a matriz extracelular (MEC) por meio de alterações célula-célula e célula-matriz facilitando o processo de invasão celular. Ao mesmo tempo, a decídua e o trofoblasto liberam inibidores de metaloproteinases (TIMPs) as quais antagonizam as atividades proteolíticas das MMPs, restringindo assim a invasão trofoblástica (LALA; GRAHAM, 1990; BURROWS; KING; LOKE, 1996; VARANOU et al., 2006). No entanto, qualquer alteração na funcionalidade das metaloproteinases, oriunda por patógenos ou outras doenças, podem comprometer o sucesso da invasão, como acontece na pré-eclâmpsia. Neste

caso, a expressão gênica da MMP-9 encontra-se alterada (SHIMONOVITZ et al., 1994; LIM et al, 1997; GOLDMAN-WOHL; YAGEL, 2002).

1.1.3. Endoreduplicação

O desenvolvimento da placenta é um processo altamente dependente da proliferação, migração e invasão celular (GENBACEV; MILLER, 2000). No entanto, durante o processo de invasão estão relacionadas algumas características como a poliploidia celular e a diferenciação em células gigantes pelo processo de endoreduplicação (HANDSCHUH et al., 2007; ZYBINA et al., 2002).

Células eucariotas possuem seu ciclo celular dividido em duas grandes fases: mitose, na qual ocorre a divisão celular; e intérfase, na qual a célula aumenta seu volume, sintetiza constituintes celulares, duplicando suas organelas, seu material genético, e pode ser subdividida em G1, S e G2. Alguns tipos celulares são capazes de realizar uma endoreduplicação programada, também denominada de endociclos, em que durante a intérfase o material genético é duplicado sem que ocorra a mitose celular, originando assim, células gigantes, ativas e com baixo potencial proliferativo (LILLY; DURONIO, 2005; CALVI, 2006; INZÉ; DE VEYLDER, 2006; MARTINDILL; RILEY, 2008). Ainda não se sabe claramente o que desencadeia o processo de endoreduplicação, mas sabe-se que alterações no meio celular, como a diminuição do fator de crescimento de fibroblastos (FGF4) e geminina, proteína responsável pela supressão da replicação do DNA durante a fase S do ciclo celular (ULLAH, 2008), a diminuição de ciclinas mitóticas e a diminuição de inibidores de endoreduplicação, podem desencadear o processo de diferenciação de células trofoblásticas extravilosas em células trofoblásticas gigantes (MARTINDILL; RILEY, 2008) (**Figura 2**). O processo de endoreduplicação não é um evento comum nas células eucariotas. Tal fenômeno

está presente em duas situações: na diferenciação de TEV em células gigantes (CROSS, 2005); e na diferenciação de megacarioblastos em megacariócitos (RAVID et al., 2002).

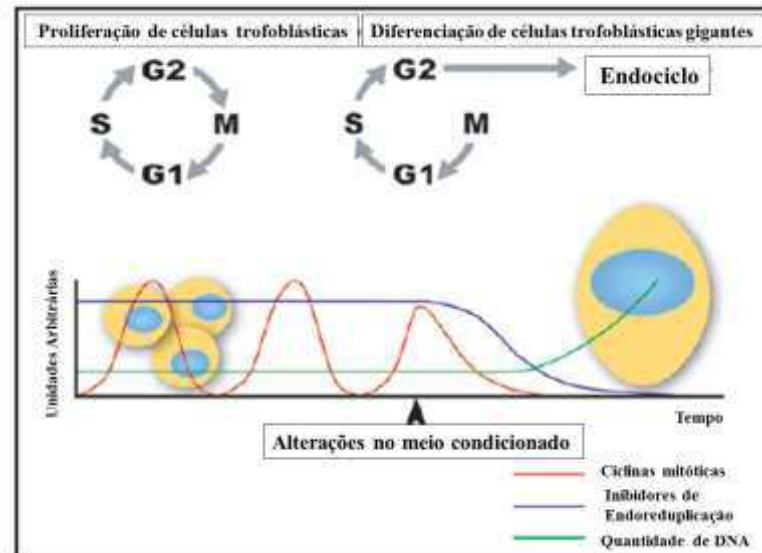


Figura 2. Diferenciação de células trofoblásticas gigantes. A diferenciação de células trofoblásticas em células trofoblásticas gigantes ocorrem ao final da fase G2 do ciclo celular mitótico. O pré-requisito para a entrada no endociclo é a ativação dos inibidores de ciclinas mitóticas. Ao iniciar o processo de endoreduplicação ocorre a replicação do material genético sem a ocorrência de mitose dando origem a células poliploides. M, mitose; G1, fase 1; S, intérfase; G2, fase 2. (Adaptada: MARTINDILL; RILEY, 2008).

O ciclo celular em eucariotos é controlado por uma ampla variedade de moléculas, dentre elas as quinase dependentes de ciclinas (CDKs) e os inibidores de quinase dependentes de ciclinas (CDKI) (DE FALCO et al., 2004; PESIN; ORR-WEAVER, 2008). As CDKIs são capazes de se ligar ao complexo ciclina-CDK alterando a regulação das fases do ciclo celular. No entanto, ainda não se sabe o grau de envolvimento da CDKs no processo de endoreduplicação, uma vez que trabalhos demonstraram que na ausência de atividade da CDK1 a endoreduplicação acontecia somente em algumas linhagens celulares (VASSILEV et al., 2006; HOCHEGGER et al., 2007).

Uma das famílias das CDKIs é Cip/Kip com membros como a p21, p27 e p57, que são capazes de se ligar a diversos tipos de quinase inibindo suas atividades. A proteína p57, por

exemplo, inibe a atividade da ciclina D/CDK4, da ciclina A/CDK2 e da ciclina E/CDK2 (MATSUOKA et al., 1995; SHERR; ROBERTS, 1999). Além disso, foi observada a presença da p57 em citotrofoblastos vilosos, invasivos, bem como em células da decídua humana (FUKUNAGA, 2002; KORGUN et al., 2007). Ullah (2008) observou uma importante relação da p57 com os processos de endoreduplicação. Células trofoblásticas na ausência de p57 não realizavam a endoduplicação, acentuando os processos de proliferação, provocando a formação de placentomegalia, e de invasão levando ao desenvolvimento de placenta acreta (FUKUNAGA, 2002; GUPTA et al., 2012; BANET et al., 2014). Por outro lado, alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular, como uma acentuada expressão de p57 foi relacionada com a ocorrência de pré-eclâmpsia (UNEK et al., 2014a).

Ainda não há relatos na literatura da influência de patógenos no processo de endoreduplicação trofoblástica envolvendo a p57. Assim, é bastante atrativo o entendimento da influência de parasitos como *T. gondii* nos processos de invasão, migração e endoreduplicação de células trofoblásticas humanas.

1.2. *Toxoplasma gondii*

1.2.1 Caracterização, epidemiologia e ciclo biológico

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório com capacidade de infectar uma grande diversidade de vertebrados, como aves e mamíferos, incluindo a espécie humana (DUBEY, 2012; YAROVINSKY, 2014). *T. gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose e muitos estudos relatam que aproximadamente metade da população mundial já entrou em contato com este parasito (BLADER; SAEIJ, 2009; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

T. gondii pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidia, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma* e espécie,

Toxoplasma gondii. O parasito foi identificado em 1908 na África, por Nicolle e Manceaux (1908) em um roedor *Ctenodactylus gundi*, e no Brasil por Splendore (1908) em coelhos (KAWAZOE, 2005).

Os processos de adesão e invasão do parasito na célula hospedeira são de fundamental importância para a sobrevivência de *T. gondii*. Após a adesão do parasito na célula hospedeira, inicia-se um processo denominado *gliding*, tipo de motilidade desempenhado pelo parasito na superfície da célula hospedeira, que consiste na interação entre actina e miosina, bem como um intenso remodelamento do citoesqueleto do parasito (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; BLADER; SAEIJ, 2009). Além disso, durante o processo de adesão entre o parasito e a membrana da célula hospedeira, forma-se um complexo juncional composto por uma associação de proteínas liberadas pelas roptrias e micronemas, que auxiliam no processo de internalização do parasito levando a formação do vacúolo parasitóforo (DUBREMETZ, 2007; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Estruturas do parasito, os chamados grânulos densos, após o processo de invasão na célula hospedeira, liberam no interior do vacúolo parasitóforo proteínas que garantem a nutrição e impedem a fusão do vacúolo com lisossomos (SIBLEY, 2004; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; SOUZA et al., 2010).

Os antígenos de *T. gondii* são formados por antígenos de superfície e por proteínas específicas secretadas pelas roptrias, micronemas grânulos densos (CHING et al., 2013). Dentre estas proteínas estão a SAG1, como antígeno de superfície (NAM et al., 1996), a ROP2, secretada pelas roptrias (BECKERS et al., 1994), a MIC2, secretada pelos micronemas (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008) e as GRA2 e GRA3 secretadas pelos grânulos densos (BERMUDES et al., 1994; NAM, 2009). Diversos trabalhos têm utilizado o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) pela sua capacidade de induzir respostas imunes (MA et al., 2009; BARENCO, 2013; DA COSTA, 2013; KHAMMARI et al., 2014). A SAG1, por exemplo,

tem sido relatada como um dos principais antígenos imunogênicos. A proteômica completa do STAg ainda não é bem estabelecida, porém estudos relacionados a proteômica de taquizoítos têm sido desenvolvidos (MA et al., 2009; QIU; GE; WANG, 2015).

Além destas proteínas bastante estudadas, sabe-se que *T. gondii* secreta metaloproteinases conhecidas como toxolisinas, proteínas relacionadas as roptrias e micronemas que são fundamentais no processo de invasão na célula hospedeira (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011; HAJAGOS et al., 2012; OLIVEIRA, 2013). Dentre as toxolisinas, destacam-se a toxolisina 1 (TLN1) e a toxolisina 4 (TLN4), encontradas nos produtos solúveis secretados por taquizoítos durante o processo de invasão. A TLN1 é uma metaloproteinase secretada pelas roptrias (HAJAGOS et al., 2012), enquanto que a TLN4 é encontrada nos micronemas, sendo secretadas de maneira dependente de cálcio (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011). Estas proteínas solúveis, quando ativadas podem provavelmente interferir nos processos de invasão das células trofoblásticas acentuando a atividade das MMPs secretadas pelas células trofoblásticas, como forma do parasito potencializar sua disseminação no organismo hospedeiro.

T. gondii possui três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). O taquizoíto possui uma forma alongada com a parte anterior pontiaguda e a parte posterior mais arredondada apresentando de 2 a 8µm de comprimento (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Esta forma infectante é capaz de invadir, por penetração ativa, diversas células nucleadas do hospedeiro permitindo uma rápida replicação e disseminação, além de infectar diversos locais do organismo, tais como: tecido muscular esquelético e cardíaco, região ocular e placenta caracterizando a forma aguda da infecção (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012; HARKER; UENO; LODOEN, 2015). Em função da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos se diferenciam

em bradizoítos, um estágio de latência do protozoário, estabelecendo a fase crônica da toxoplasmose (DUBEY, 1997; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Esta rápida diferenciação é fundamental para a formação dos cistos teciduais, responsáveis pela sobrevivência do parasito no hospedeiro (IHARA; NISHIKAWA, 2014). Os bradizoítos, por apresentarem uma lenta taxa de replicação, podem permanecer viáveis no interior dos cistos por toda a vida do hospedeiro, no entanto, se o status imunológico for comprometido, inicia-se um processo de reagudização da infecção e podem retornar a forma de taquizoítos e apresentar uma rápida multiplicação (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HARKER; UENO; LODOEN, 2015). Estes cistos teciduais podem ser encontrados em diversos tecidos, mas aparecem com maior frequência em tecidos nervosos e musculares do hospedeiro (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012). Os esporozoítos são encontrados em oocistos, presentes nas fezes de felídeos, os hospedeiros definitivos do parasito (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Em um período de 1 a 5 dias após serem lançados no ambiente sofrem um processo de esporulação e passam a apresentar em seu interior dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Os oocistos morfologicamente apresentam-se ovóides medindo cerca de 11 a 13µm com uma parede dupla conferindo uma alta resistência a danos químicos e mecânicos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O ciclo biológico de *T. gondii* é considerado heteroxênico por apresentar hospedeiros definitivos e intermediários. O ciclo sexuado desse parasito se completa apenas em hospedeiros definitivos, que neste caso são animais dos gêneros *Felix* e *Lynx*; no entanto, o ciclo assexuado ocorre na maioria dos vertebrados endotérmicos, como aves e mamíferos, além do próprio hospedeiro definitivo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; KAWAZOE, 2005; DA SILVA; LANGONI, 2009).

Quando o hospedeiro definitivo ingere qualquer uma das formas infectantes de *T. gondii*, estas iniciam um rápido processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia formando os merozoítos no epitélio intestinal do hospedeiro, que invadem novas células originando os gametas masculinos e femininos e quando fecundados formam oocistos altamente resistentes (NEVES, 2003; DUBEY, 2004). Felinos acometidos pela toxoplasmose podem liberar no meio ambiente cerca de 20 milhões de oocistos contendo esporozoítos infectantes (DUBEY, 2001). O homem pode adquirir a toxoplasmose por meio da ingestão de carnes cruas ou mal cozidas de animais contendo cistos; água ou alimentos contaminados com oocistos; líquidos orgânicos contendo taquizoítos; transfusão sanguínea ou mesmo por transmissão transplacentária (SILVA; LANGONI, 2009). No epitélio intestinal do hospedeiro, qualquer uma das três formas infectantes se multiplica intensamente e infectam novos tipos celulares sendo responsáveis assim pela manifestação da fase aguda da infecção. Com a resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, que sofrem encistamento, correspondendo à fase crônica da toxoplasmose (NEVES, 2003; HUNTER; SIBLEY, 2012). A figura que se segue mostra resumidamente o ciclo de vida de *T. gondii*.

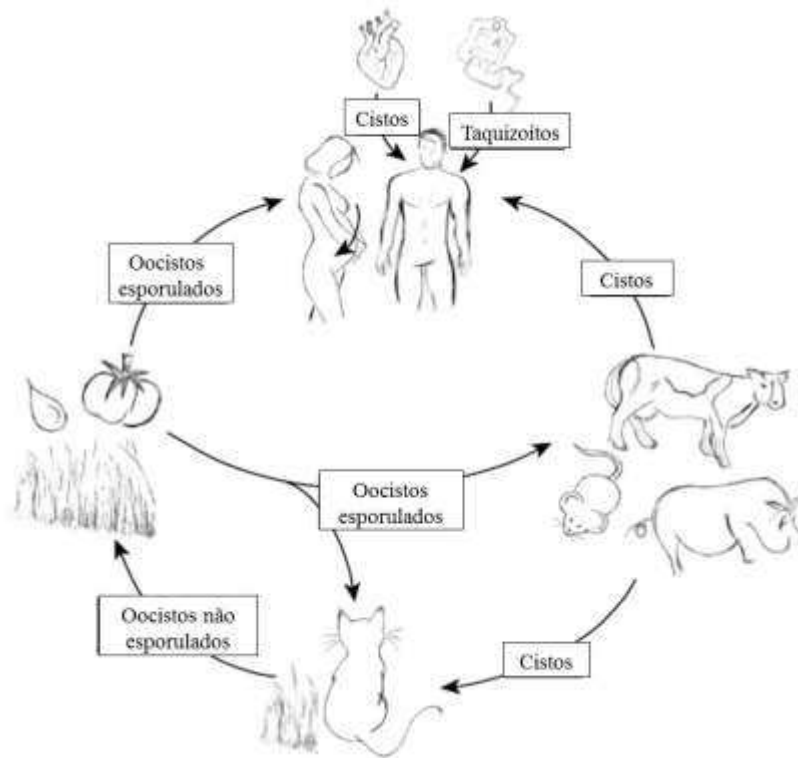


Figura 3. Ciclo biológico do *T. gondii*. O ciclo biológico do *T. gondii* se dá em hospedeiros definitivos (felídeos) e intermediários (animais homeotérmicos). Os hospedeiros definitivos liberam no ambiente, através das fezes, oocistos não esporulados que após 1-5 dias sofrem esporulação e adquirem potencial infectante. Em hospedeiros intermediários, quando infectados, os cistos são alojados nos tecidos. Os felídeos geralmente se infectam após ingerirem cistos contidos nos tecidos de suas presas ou oocistos maduros no ambiente. Humanos podem se infectar por meio da ingestão de cistos em carnes cruas ou oocistos em água e vegetais, transfusão sanguínea, transplante ou transmissão congênita. Após a ingestão de oocistos ou cistos pelos hospedeiros intermediários, estes se transformam em taquizoítos, os quais atingem a corrente sanguínea e se disseminam diversos locais do corpo originando cistos teciduais. (Adaptado de DARD et al., 2016).

A prevalência mundial de infecção em gestantes é bem variável podendo oscilar entre 1% e 92% (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009; VAZ et al., 2010; LOPES et al., 2012). Ao contrário da América do Norte, em que a prevalência da infecção durante a gestação é baixa, na América Latina estes índices podem atingir 70% (BARBOSA; HOLANDA; ANDRADE-NETO, 2009; BABAIE et al., 2013; MUNOZ-ZANZI; CAMPBELL; BERG, 2016). Estes dados mostram a importância de se estudar toxoplasmose congênita, visto que é um grave problema de saúde pública no Brasil. No estado de Tocantins, um estudo demonstrou que 71% das gestantes avaliadas eram positivas para toxoplasmose em exames

sorológicos (ROCHA et al.; 2015). Trabalhos realizados no estado de Minas Gerais associaram a alta prevalência de toxoplasmose congênita às condições socioeconômicas precárias, em que o número de recém-nascidos com toxoplasmose pode atingir uma prevalência de 76 a 79 a cada 1000 neo-natos (CARRELOS et al, 2014a, 2014b). Diante disso, é de fundamental importância estudos que esclareçam os processos que influenciam na transmissão da toxoplasmose congênita.

1.2.2 Toxoplasmose congênita e a resposta imune durante a gestação

Em humanos imunocompetentes, a infecção pode se apresentar de forma assintomática, porém, em indivíduos imunocomprometidos ou em fetos infectados congenitamente, a infecção por *T. gondii* pode apresentar graves complicações (WEISS; DUBEY, 2009; KODYM et al., 2015; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015).

A toxoplasmose congênita se estabelece, comumente, quando a mulher adquire a infecção durante a gestação (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; CHAUDHRY et al., 2014), no entanto, pode ocorrer também no período pré-concepcional (KODJIKIAN, 2010). Neste último caso, a gestante acometida pela fase crônica da toxoplasmose pode sofrer uma reagudização da infecção em função da condição imune e transmitir o parasito ao feto (RORMAN et al., 2006; LINDSAY; DUBEY, 2011; CHAUDHRY et al., 2014; SARKARI; ABDOLAHY; KHABISI, 2015).

O período gestacional em que ocorre a infecção materna é fundamental para a determinação de complicações para o feto (RICO-TORRES; VARGAS-VILLAVICENCIO; CORREA, 2016). Mulheres quando infectadas durante o primeiro trimestre de gestação apresentam cerca de 10% de chance de transmitir a toxoplasmose via transplacentária, porém com o avanço desse período (terceiro trimestre), as chances de transmissão vertical aumentam em 70%. Caso a infecção ocorra em períodos mais tardios da gestação, as consequências para

o feto são menos graves, além de diminuir as chances de aborto (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, 2016). Sendo assim, nos primeiros meses de vida, o recém-nascido pode não apresentar sintomas da toxoplasmose, no entanto, em anos subsequentes pode desenvolver calcificação intracraniana, retinocoroidite ou mesmo retardamento mental (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; WEISS; DUBEY, 2009; VILLE; LERUEZ-VILLE, 2014).

Para o sucesso da gestação é necessário que haja alterações fisiológicas e hormonais que favoreçam o balanço entre os perfis pró-inflamatório, Th1, e anti-inflamatório, Th2, do sistema imunológico (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001; FEST et al., 2007; SYKES et al., 2012). As principais células mediadoras deste processo de equilíbrio entre perfis Th1 e Th2 são as células T reguladoras (Treg) (SYKES et al., 2012). A gestação é caracterizada por basicamente três etapas imunológicas (KOGA; ALDO; MOR, 2009). No período inicial da gestação, há um perfil imune pró-inflamatório com elevada produção de citocinas pelas células T helper do tipo 1 (Th1), fundamentais no processo de implantação do embrião no endométrio uterino (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Já o segundo trimestre gestacional é caracterizado por um perfil imunológico preferencialmente anti-inflamatório (Th2), que permite o desenvolvimento fetal com sucesso devido a uma tolerância do sistema imunológico materno em relação aos antígenos fetais (RANGO, 2008; REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012). O terceiro trimestre, por sua vez, volta a apresentar um perfil pró-inflamatório, especialmente nas últimas semanas gestacionais, a fim de proporcionar condições fisiológicas para parto (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

A atividade que o sistema imunológico desempenha durante a gestação é complexo, no sentido em que o organismo materno deve manter um perfil anti-inflamatório para a manutenção da gestação (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011), que contraditoriamente pode favorecer um quadro de infecção parasitária (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001;

BARBOSA et al., 2008; SYKES et al., 2012). Neste sentido, quando a gestação se dá de maneira simultânea à infecção por *T. gondii*, por exemplo, pode desencadear um desequilíbrio imunológico ocasionando complicações graves ao feto, como o aborto (LUPPI, 2003). Isso se dá porque o organismo materno induz uma resposta pró-inflamatória a fim de controlar a infecção que, concomitantemente, desfavorece o desenvolvimento fetal (SYKES et al., 2012).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram a influencia de algumas citocinas envolvidas no controle da infecção por *T. gondii* ou na manutenção da gestação em relação à susceptibilidade ao parasito pelas células trofoblásticas humanas da linhagem BeWo (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). Na presença de interleucina-10 (IL-10) e do fator transformador de crescimento beta (TGF- β 1), células trofoblásticas BeWo se mostraram susceptíveis à infecção por *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008). No entanto, a citocina pró-inflamatória IFN- γ , que supostamente deveria controlar a infecção parasitária, não foi capaz de controlar a invasão e replicação de *T. gondii* quando adicionadas às células BeWo (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). Isto denota o marcante perfil imunomodulador que as células trofoblásticas apresentam podendo influenciar, inclusive, outras células presentes no microambiente uterino. Castro e colaboradores (2013) demonstraram que células trofoblásticas são capazes de regular a produção de citocinas e a susceptibilidade de monócitos humanos (linhagem THP-1) frente à infecção por *T. gondii*.

Por outro lado, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a infecção por *T. gondii* em células BeWo foi controlada apenas quando doses altas da citocina fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foram adicionadas (BARBOSA et al., 2014). Além disso, o antígeno solúvel de *T. gondii*, aumentou a produção de MIF em células trofoblásticas de vilos coriônicos oriundos de placentas de primeiro trimestre gestacional (FERRO, 2008). Ainda em relação aos vilos coriônicos, um estudo de Gomes e colaboradores (2008) demonstrou que células trofoblásticas oriundas de placenta de terceiro trimestre gestacional são mais

susceptíveis à infecção por *T. gondii* quando comparadas aos vilos do período inicial da gestação, e isso provavelmente se deve à maior produção de MIF durante o primeiro trimestre, que tende a controlar o parasitismo.

Em outro trabalho com células trofoblásticas extravilosas, linhagem celular HTR-8/SVneo, foi observado que o *T. gondii* é capaz de modular o alto índice de apoptose nos trofoblastos afim de favorecer seu estabelecimento e disseminação nas células do hospedeiro (GUIRELLI et al., 2015).

Portanto, muitos estudos buscam avaliar a resposta imunológica de células trofoblásticas humanas frente a infecção por *T. gondii*, porém não existe na literatura científica nenhum estudo até o momento que demonstre a influência deste parasito nos processos de migração, invasão e endoreduplicação do trofoblasto humano.

1.3. Linhagem celular

O SV40 é um vírus pertencente à família *Papovaviridae*, e originário do macaco Rhesus (COLE, 1996; BUTEL, 2000). No interior da célula hospedeira, o vírus induz a produção de proteínas que auxiliam a replicação viral. No entanto, estas proteínas virais, denominadas antígeno T (Ag T), estimulam também a divisão de células que não se encontram em fase de divisão celular, de modo que a constante síntese destas proteínas confere a célula um caráter proliferativo ilimitado (COLE, 1996).

Células trofoblásticas extravilosas humanas foram transformadas a partir da transfecção do Ag T do vírus símio, SV40, originando a linhagem celular HTR-8/SVneo. A transfecção confere à célula uma capacidade de divisão ilimitada, ao mesmo tempo em que mantém as características de células trofoblásticas extravilosas humana (GRAHAM et al, 1993).

Diversos estudos têm utilizado a linhagem celular HTR-8/SVneo como modelo *in vitro* por possuir as características moleculares e funcionais de células trofoblásticas extravilosas humana de primeiro trimestre gestacional (LIU et al., 2014; GUIRELLI et al., 2015; WANG et al., 2015; YANG et al., 2015). Diante disso, o presente estudo utilizou as células HTR-8/SVneo com o intuito de melhorar a compreensão sobre os processos biológicos de invasão, migração e endoreduplicação celular *in vitro* de células HTR-8/SVneo sob a influência de *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA

As células trofoblásticas desempenham uma função fundamental na placentação, que por meio dos processos de proliferação, migração e invasão permitem uma maior estabilidade no desenvolvimento da gestação. A capacidade invasiva das células trofoblásticas extravilosas é delicadamente controlado pelas próprias células, por meio da transformação em células gigantes perdendo sua capacidade invasiva, bem como por meio das células da decídua materna. É de fundamental importância que o processo de invasão seja equilibrado, pois uma diminuição na capacidade invasiva levaria a complicações como pré-eclampsia e, por outro lado, um aumento no processo de invasão poderia levar ao desenvolvimento de placenta acreta causando danos graves à gestante e ao feto. Um grupo de pesquisadores italianos, que realizam estudos com pré-eclâmpsia, observaram que gestantes que faziam uso de antibióticos não desenvolviam tal patologia. Então foi levantada a hipótese de que a pré-eclâmpsia poderia ter relações com agentes infecciosos, como por exemplo, *T. gondii*. A toxoplasmose congênita é uma doença que afeta significativamente o processo gestacional, levando a graves sequelas a neonatos e crianças. A toxoplasmose congênita é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, portanto estudos que possam esclarecer a relação existente entre o parasito e a interface materno-fetal são cruciais para o desenvolvimento de futuras estratégias profiláticas e/ou terapêuticas.

Diante da importância do adequado processo de placentação e da influência de *T. gondii* no curso da gestação, o presente trabalho visa contribuir para uma melhor elucidação da relação do parasito com os processos de invasão, migração e endoreduplicação de células trofoblásticas humanas extravilosas.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg) nos processos de invasão, migração e endoreduplicação das células trofoblásticas extravilosas humanas da linhagem HTR-8/SVneo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a invasão e migração de células HTR-8/SVneo tratadas ou não com STAg;
- Avaliar a secreção das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) em células HTR-8/SVneo tratadas ou não com STAg;
- Avaliar a expressão da proteína p57 em células HTR-8/SVneo tratadas ou não com STAg.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção de células HTR-8/SVneo e BeWo em cultura

A linhagem celular HTR-8/SVneo, originada do citotrofoblasto extraviloso humano, foi cedida pela Profa. Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil e as células trofoblásticas derivadas de carcinoma humano (linhagem BeWo) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) para o Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram mantidas em cultura ou armazenadas adequadamente em nitrogênio líquido.

Estas células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) contendo meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 25 mM de HEPES, 3 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e 1% de antibióticos (10.000 U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina) (Sigma, St Louis, MO, EUA) e mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂.

A manutenção das células HTR-8/SVneo e BeWo foi realizada a cada dois dias. As células foram lavadas com meio de cultura novo e em seguida adicionada ao frasco solução de 0,25% tripsina-0,02% EDTA (Sigma) por 5 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. A tripsina foi inativada com meio RPMI completo (suplementado com 10% de SFB, 25 mM de HEPES, 3 mM de bicarbonato de sódio e antibióticos) e as células então removidas e transferidas para tubos de 15ml foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram distribuídas em novos frascos de cultura com 15 ml de meio RPMI completo e novamente incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. O excedente de células foi congelado em meio de congelamento (90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) e mantido em nitrogênio líquido.

4.2. Manutenção de *T. gondii* em cultura e produção de antígeno solúvel de taquizoítos (STAg)

Os taquizoítos de *T. gondii* foram descongelados do nitrogênio líquido e mantidos em células BeWo *in vitro* e a cada 48 horas, período em que a maioria das células estavam lisadas pelo parasito, os taquizoítos livres foram centrifugados (400 x g, 5 minutos) e adicionados a novos frascos de cultura contendo células BeWo não infectadas.

Com o propósito de produzir antígeno solúvel de *T. gondii*, taquizoítas livres provenientes dos frascos de células lisadas foram tratados com inibidores de protease (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 50 µg/ml e fenil-metil-sulfonil fluoreto – PMSF a 1,6 mM) e tampão de lise (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150mM, TRITON x-100 1%, deoxicolato de sódio 1%, SDS, H₂O_d). Dez ciclos de choque térmico em nitrogênio líquido e água morna (entre 33 e 36 °C) foram usados para promover a lise das suspensões contendo os taquizoítos, em seguida, foram submetidos à técnica de sonicação (6 ciclos de 1 minutos de 60Hz). Centrifugou-se a suspensão de antígenos (10000 x g, 30 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi filtrado em membrana com poro de 0,22 µm. Por fim, o sobrenadante foi aliquotado e armazenado à -80 °C. Para a determinação da concentração de proteína foi utilizado o método *Lowry* (1951). No presente trabalho foi utilizada a concentração de STAg (30 µg/ml) baseado no trabalho de Ferro e colaboradores (2008).

4.3. Tratamento das células HTR-8/SVneo com STAg

As células HTR-8/SVneo cultivadas em frascos de cultura foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos e ressuspensas em 1ml de RPMI completo. Com o auxílio da câmara de *Newbauer*, as células viáveis foram contadas e adicionadas (5x10⁵ células/2mL/poço) em placas de 6 poços. Após 24 horas, os sobrenadantes de todos os poços foram removidos e ao grupo controle foi adicionado 2ml de meio RPMI completo com 1% SFB e ao grupo tratado

adicionado uma solução de STAg (30µg/ml) em meio RPMI completo com 1% SFB. As células HTR-8/SVneo foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Ao final deste período, os sobrenadantes de cultura livre de células foram coletados dos poços e armazenados a -80 °C para posterior análise da secreção de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9. Já as células, por sua vez, foram removidas mecanicamente da placa por meio de *cell screaper* juntamente com a adição tampão de lise contendo inibidores (inibidores de proteases, NaVO₄ e NaF) e lisadas com 3 ciclos de congelamento e descongelamento (nitrogênio líquido/aquecidas a 37 °C) seguidos de uma centrifugação a 400 x g por 5 minutos. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em *freezer* a -80 °C para posteriores dosagens de proteínas totais e análises por *Western Blotting* para avaliação da expressão da proteína p57.

4.4. Liofilização do sobrenadante de células HTR-8/SVneo tratadas com STAg

Os sobrenadantes de cultura celular de HTR-8/SVneo apresentou uma baixa concentração de proteínas no volume coletado (2mL) dos poços das placas de cultura. Por este motivo, os sobrenadantes foram liofilizados em tubos separados, ressuspensos em 50µl de água destilada e novamente armazenados em *freezer* a -80 °C para posteriores análises da secreção de MMP-2 e MMP-9.

4.5. Ensaio de invasão por Matrigel e migração por *Transwell*

Os ensaios de invasão e migração foram realizados em placas de 24 poços contendo *Transwells*. As células HTR-8/SVneo foram removidas dos poços, centrifugadas a 400 x g, por 5 minutos, ressuspensas em 1ml de meio RPMI completo e novamente com o auxílio da câmara de *Newbauer* foram contadas e adicionadas na parte superior do *Transwell* (5x10⁴ célula/100µl/*Transwell*). Para o ensaio de invasão foi preparada uma solução de Matrigel

(1:10 em RPMI 1640) e desta adicionou-se 15µl na parte superior de cada *Transwell* mantendo-os a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, para os ensaios de invasão e migração adicionou-se 500µl de meio RPMI suplementado com 10% de SFB na parte inferior e 100µl da suspensão celular (5×10^4 célula/100µl/*Transwell*) em meio RPMI a 1% de SFB ou meio RPMI a 1% de SFB adicionado de STAg (30µg/ml) na parte superior. A placa com *Transwells* foi então, mantida a 37 °C por 4 horas para o ensaio de migração e por 24 horas para o ensaio de invasão com Matrigel.

Após o fim dos experimentos de migração e invasão, as membranas dos dois ensaios foram submetidas aos mesmos protocolos de processamento e análise. Foram removidos os meios da parte superior e inferior do inserto. Com o auxílio de hastes flexíveis de algodão as células da parte superior da membrana do *Transwell* também foram removidas. Já as células da parte inferior da membrana foram lavadas com 600µl de PBS [1x] sob agitação por 5 minutos, fixadas com 600µl de acetona e metanol (1:1) por 10 minutos e, em seguida, submetidas à outra lavagem com PBS. As membranas do *Transwell* foram coradas com Azul de Toluidina e o excesso de corante foi retirado em água destilada. Posteriormente estas foram deixadas em temperatura ambiente por um período de 4 horas para que secassem e depois foram cortadas e removidas de cada *Transwell*. As membranas foram montadas em lâminas e analisadas ao microscópio de luz (YANG, et al., 2015). Cada membrana foi dividida em quatro quadrantes, de modo que em cada um destes foram selecionados 5 campos para a contagem do número de células. Todas as células da borda da membrana foram desconsideradas da contagem.

4.6. Western Blotting

Pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), foi realizada a dosagem proteica dos lisados celulares obtidos do processo de criólise (análise da p57) e dos sobrenadantes

lioofilizados de cultura celular de células HTR-8/SVneo (análise das MMPs). A concentração total de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) foi utilizada para padronizar a carga protéica para as reações de *Western Blotting*. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida (8%) sobre condições desnaturantes (SDS-PAGE) com as amostras dos lisados celulares, para avaliação da p57 ou com as amostras dos sobrenadantes de cultura liofilizados, para análise das MMPs. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Imobilon-FL®, Merck S/A) e incubadas com tampão de *blotting* (25mM Tris, 0,15 NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,4) contendo 4% de leite desnatado desidratado (Molico, Nestlé®) por 1 hora. A seguir as membranas foram incubadas primeiramente com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- p57 humana (1:500, R&D Systems), anticorpo policlonal de coelho anti-MMP-9 humana (1:1000; abcam®), anticorpo monoclonal de camundongo anti-MMP-2 humana (1:1000; abcam®) e anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina humana (Santa Cruz Biotechnology) durante 12 horas a temperatura ambiente. Após consecutivas lavagens em tampão de *blotting*, os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, foram adicionados às membranas por um período de 2 horas também a temperatura ambiente. Depois de novas lavagens com tampão de *blotting*, as membranas foram então reveladas pela reação de quimioluminescência e a intensidade das bandas quantificadas em transluminador ChemiDoc-MP imaging (BIO-RAD Laboratories Inc, Hercules CA). Quantidades iguais de proteínas (50 μg) por poço do gel de eletroforese foram confirmadas pela coloração de *Ponceau* 1% e usadas para as análises densitométricas. A densitometria foi realizada usando o software ChemiDoc-MP (BIO-RAD Laboratories Inc, Hercules). Os valores foram mostrados pela densidade relativa da razão das bandas específicas de cada proteína e β -actina, para análise da p57 ou coloração por *Ponceau*, para análise das metaloproteinases secretadas.

4.7. Normas de biossegurança

Os procedimentos de cultura celular, assim como o manuseio de equipamentos, vidrarias e reagentes químicos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança exigidas (MINEO et al., 2005).

4.8. Análise Estatística

Os experimentos de avaliação da proteína p57, de invasão e migração foram realizados em triplicata, ao contrário da avaliação das MMP-2 e MMP-9, que foram feitas em duplicatas. Todos os experimentos foram realizados em três eventos independentes.

As análises estatísticas foram realizadas sob os valores de porcentagem normalizados para cada experimento. Para a normalização dos dados em porcentagem foi realizado a média dos valores do grupo controle, e esta equiparada a 100%. Cada resultado percentual do grupo tratado com STAg foi calculado com base no valor da média do grupo controle.

Os dados foram analisados como média e desvio padrão ou mediana e erro padrão usando o programa *GraphPad Prisma* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As comparações entre condições pares foram realizadas pelo *teste t* de Student, para dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para dados não paramétricos. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 O estímulo com STAg aumentou a capacidade invasiva de células HTR-8/SVneo.

Visto que a expressão da proteína p57 diminuiu em células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg, buscou-se investigar a influência deste estímulo nos processos de invasão e migração das células HTR-8/SVneo. Observou-se que células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg apresentaram um aumento significativo na capacidade invasiva pelo Matrigel quando comparadas com células não estimuladas ($p < 0,05$) (**Figura 4A, B**). No entanto, o processo de migração não apresentou nenhuma diferença significativa com relação às células sem estímulo (**Figura 4A, C**).

5.2 O estímulo com STAg aumentou a secreção da metaloproteinase MMP-2 em células HTR-8/SVneo

Após a observação da diminuição da expressão da proteína p57 e do aumento da capacidade invasiva de células HTR-8/SVneo, investigou-se então a secreção das MMP-2 e MMP-9 no sobrenadante de cultura dessas células trofoblásticas extravilosas. Os resultados demonstraram que a secreção da MMP-2 sofreu um aumento significativo em células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg quando comparado às células não estimuladas ($p < 0,05$) (**Figura 5A, B**). Por outro lado, a MMP-9 não apresentou alteração significativa em sua secreção nas células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg quando comparadas às células sem estímulo de STAg (**Figura 5C, D**).

5.3 O estímulo com STAg reduziu a expressão da proteína p57 em células HTR-8/SVneo

Foi avaliada a expressão da proteína p57 em células HTR-8/SVneo frente ao estímulo ou não com STAg. Os resultados mostraram que a expressão da proteína p57 foi reduzida significativamente em células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg quando comparadas às células não estimuladas ($p < 0,05$) (**Figura 6**).

6. DISCUSSÃO

O sucesso da implantação do embrião tem como principal pré-requisito o processo de decidualização, com o influxo de células especializadas, o remodelamento das artérias espiraladas, a invasão das células trofoblásticas extravilosas na decídua (GELLERSEN; BROSENS; BROSENS, 2007; MA et al., 2015) e a endoreduplicação (ULLAH et al., 2008).

A princípio buscou-se investigar os processos de invasão e migração das células HTR-8/SVneo frente ao estímulo por STAg. Como resultado foi observado um aumento significativo na capacidade invasiva das células HTR-8/SVneo quando estimuladas com STAg em relação às células não estimuladas. No entanto, em relação ao processo de migração trofoblástica, não foi observado diferenças significativas quando comparadas às células sem estímulo de STAg. Dessa maneira o estímulo com STAg leva uma diminuição da expressão da p57 e consequentemente o aumento da invasão trofoblástica.

Diversos trabalhos têm relacionado o aumento da invasão trofoblástica com fatores imunológicos mediados por células NK (KNOFLER, 2010; HAMMER, 2011), com a diminuição de citocinas como TGF- β , IFN- γ e TNF- α (BAUER et al., 2004; BILBAN et al., 2004; POLLHEIMER; HUSSLEIN; KNOFLER, 2005a; LASH et al., 2006). Além disso, a ativação de vias de sinalização STAT5 (OSPINA-PRIETO et al., 2015) e STAT3 (FITZGERALD et al., 2008; KO et al., 2016) e a associação de CD44 com ácidos hialurônicos em células trofoblásticas (TAKAHASHI et al., 2014) foram associadas à um aumento no processo de invasão destas células. Estudos recentes demonstraram a relação entre a secreção de metaloproteinase de matriz extracelular (LI et al., 2015; CHAM et al., 2015) e a redução ou mesmo a ausência da expressão de p57/kip2 (BANET et al., 2014) com o aumento da capacidade invasiva das células trofoblásticas. Inúmeros processos medeiam a invasão trofoblástica, dentre eles a p57 (UNEK, et al., 2014a,b; MA et al., 2015), que como observado neste trabalho, a redução da sua expressão favorece o processo de invasão de

células trofoblásticas extravilosas humanas. Isso demonstra que uma possível infecção por *T. gondii* durante a gestação poderia propiciar um quadro de desenvolvimento de patologias placentárias.

A capacidade invasiva das células trofoblásticas extravilosas está relacionada com a secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e sua capacidade de degradação e remodelamento da matriz extracelular (MAREEL; LEROY; 2003; STAUN-RAM; SHALEV, 2005; COHEN; MEISSER; BISCHOF, 2006; WEISS; GOLDMAN; SHALEV, 2007). Estudos demonstraram que a MMP-2 e a MMP-9 nas suas formas ativas estão presentes em células trofoblásticas extravilosas humanas e no endotélio vascular (SHIMAMORI; WATANABE; FUJIMOTO, 1995; ISAKA et al., 2003; GOLDMAN et al., 2003; SEVAL et al., 2004), além de estarem diretamente relacionadas com a capacidade invasiva dos trofoblastos extravilosos no primeiro trimestre gestacional (SHIMONOVITZ et al., 1994; ISAKA et al., 2003).

No presente trabalho, células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg apresentaram uma maior capacidade invasiva. Diante disso, procuramos avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9 em células HTR-8/SVneo estimuladas ou não com STAg. Como resultado, observou-se um aumento significativo na expressão da MMP-2 em células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg em relação às células não estimuladas. Já a MMP-9 não apresentou diferença significativa em células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg quando comparada às células não estimuladas. Dessa forma, podemos especular que o aumento da secreção de MMP-2 pode estar diretamente relacionado ao aumento do processo de invasão das células HTR-8/SVneo corroborando estudos presentes na literatura (KOCARSLAN et al., 2015; LI et al., 2015; RAPACZ-LEONARD et al., 2015). Inúmeros fatores como citocinas, hormônios e fatores de crescimento são responsáveis pelo controle do processo de invasão, promovendo o balanço entre MMPs e seus inibidores (TIMPs). Recentemente um estudo demonstrou que o

aumento da capacidade invasiva de células HTR-8/SVneo pode ser mediado pelas vias de sinalização ERK e STAT3 que regulam positivamente a expressão de MMP-2 e MMP-9 (YANG et al., 2014; KO et al., 2016). Barbosa e colaboradores (2014) relataram a importância da fosforilação de ERK 1/2 e da produção de prostaglandina (PGE₂) durante a infecção por *T. gondii* em células BeWo, o que coloca a via de sinalização de ERK como uma via em comum na regulação de MMPs e a infecção com *T. gondii*. No entanto, futuras investigações são necessárias para avaliar estas vias de sinalização em células HTR-8/SVneo estimuladas com STAg. Outro fator como a secreção de TLN pelo *T. gondii* deve ser considerado, uma vez que a metaloproteinase secretada pelo parasito pode contribuir para o aumento do processo de invasão das células trofoblásticas (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011; HAJAGOS et al., 2012; OLIVEIRA, 2013).

O processo de invasão é um mecanismo precisamente controlado pelas próprias células trofoblásticas por meio da ativação das metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz extracelular (LIU et al., 2014 WANG et al., 2015) e da diferenciação celular dos trofoblastos extravilosos em células gigantes, endoreduplicação (ULLAH et al., 2008). No processo de diferenciação celular, ou endoreduplicação, os trofoblastos extravilosos duplicam inúmeras vezes seu material genético, podendo alcançar de 8N a 64N (ZYBINA; ZYBINA, 2005), sem culminar na divisão celular resultando em células poliplóides conhecidas como células gigantes (MCAULEY; CROSS; WERB, 1998; ULLAH et al., 2009). Em situações normais, o processo de endoreduplicação é um fenômeno específico de células trofoblásticas de mamíferos que controla o processo de invasão dos trofoblastos extravilosos (CROSS, 2005). Porém, em condições patológicas este processo pode sofrer alterações. Como observado no presente trabalho, células HTR-8/SVneo quando estimuladas com STAg apresentam uma menor expressão da proteína p57, o que provavelmente impede que as células trofoblásticas se diferenciem em células gigantes

poliplóides. Outros estudos demonstraram que a p57/kip2 é responsável por desencadear a endoreduplicação, uma vez que se liga à Cdk1 inibindo sua atividade, reduzindo o processo de divisão celular e favorecendo a diferenciação de células trofoblásticas extravilosas (ULLAH et al., 2009). Foi relatado que não só a inibição de Cdk1, como também a redução do fator de crescimento de fibroblastos 4 (FGF4) em meio condicionado é capaz de cessar a proliferação celular e induzir a diferenciação de células trofoblásticas *in vitro* (CROSS, 2005; SIMMONS; CROSS, 2005; RENTY; KANEKO; DEPAMPHILIS, 2014). Vários estudos associam a baixa expressão da proteína p57/kip2 a doenças gestacionais como a placenta acreta, causada por um excesso de invasão das células trofoblásticas podendo ultrapassar os limites da decídua e atingir o miométrio (MCCONNELL et al., 2009; GUPTA et al., 2012; MURPHY et al., 2012; CHEN et al., 2014; UNEK et al., 2014b). O motivo dessa baixa expressão de p57 em quadros clínicos de placenta acreta ainda não é totalmente esclarecido.

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram diversos efeitos do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) em células trofoblásticas. STAg foi capaz de induzir a expressão de ICAM-I em células do sinciciotrofoblasto em vilos placentários de primeiro trimestre gestacional (FERRO et al., 2008), bem como induzir a produção de MIF em vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional, quanto em linhagem de células trofoblásticas BeWo (FERRO et al., 2008; GOMES, 2008; GOMES et al., 2011). Neste sentido, é possível que antígenos solúveis de *T. gondii* sejam capazes de modular a expressão da proteína p57, por mecanismos intracelulares, agindo possivelmente em vias de sinalização da p57 diminuindo a expressão da mesma, reduzindo os processos de endoreduplicação e favorecendo assim, o processo de invasão das células trofoblástica. Experimentos futuros são necessários para verificar o papel do parasito vivo neste processo de modulação da expressão de p57 e, consequentemente, na invasão e migração do trofoblasto extraviloso.

Assim, os dados aqui apresentados demonstram que as células trofoblásticas extravilosas HTR-8/SVneo quando estimuladas com antígeno solúvel de *T. gondii* apresentam uma redução na expressão de p57/kip2, promovendo um aumento na capacidade invasiva das células trofoblásticas extravilosas, possibilitado pelo aumento na secreção da MMP-2. Dessa forma, os fenômenos observados no presente trabalho permitem sugerir que eventos semelhantes possam ocorrer *in vivo*, relacionando a infecção por *T. gondii* a complicações gestacionais como o desenvolvimento patologias placentárias. No entanto, estudos posteriores necessitam ser realizados para esclarecer quais são os possíveis fatores encontrados no STAg que podem estar relacionados a via da p57, e ao aumento das metaloproteinases interferindo assim no processo de invasão celular.

7. CONCLUSÕES

As células trofoblásticas extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) ao serem estimuladas com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) reduzem a expressão da proteína p57/kip2, tendo como consequência um aumento na capacidade invasiva das células trofoblásticas extravilosas, possibilitado pelo aumento da secreção de MMP-2.

8. FIGURAS

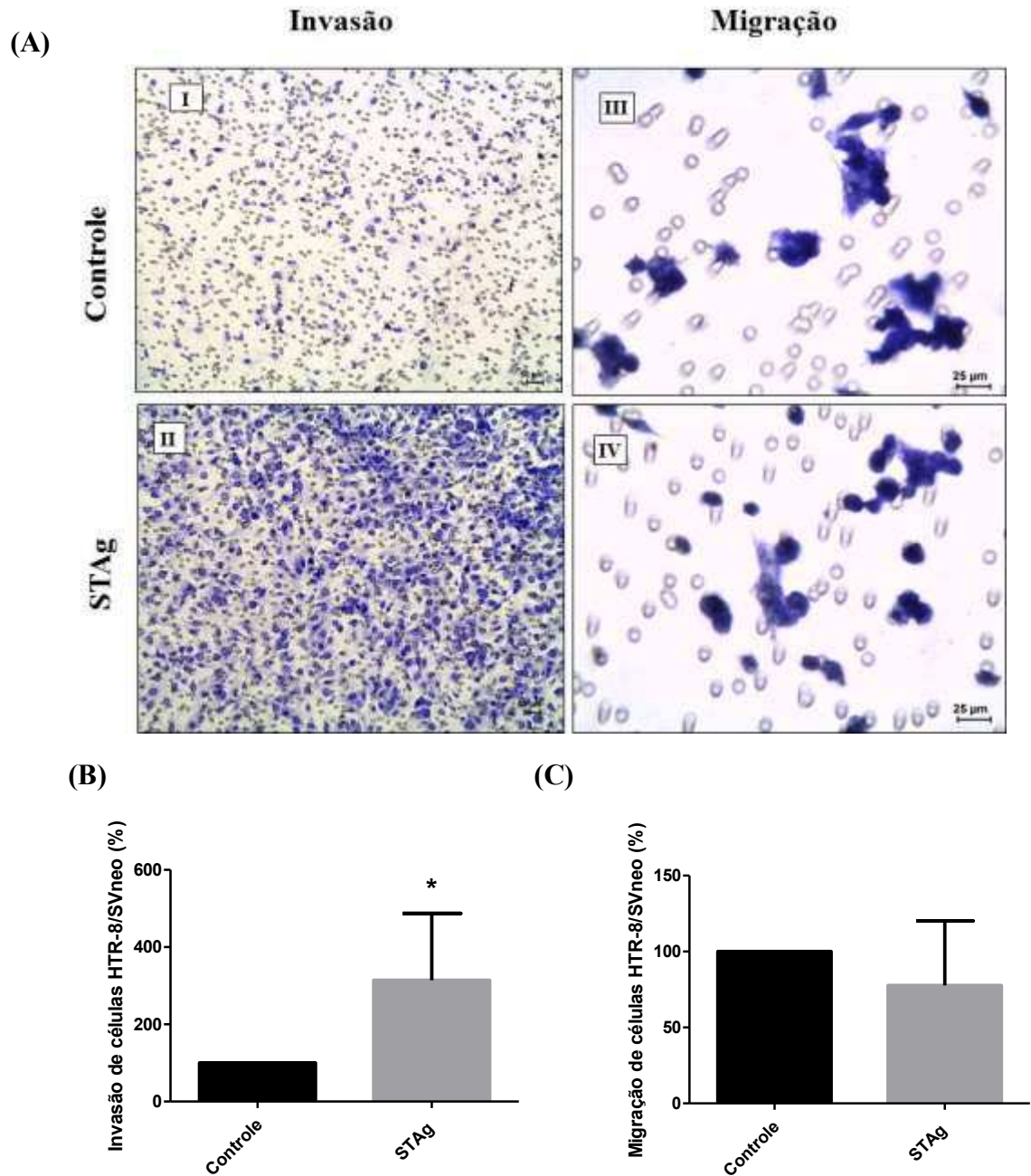


Figura 4. Índice de invasão e migração de células HTR-8/SVNeo frente ao tratamento com STAg. (A) Imagens representativas da invasão pelo Matrigel de células controle (I) e tratadas com STAg (II) e migração de células controle (III) e tratadas com STAg (IV) ambos por *Transwell*. Os gráficos representam as porcentagens de invasão (B) pelo Matrigel e migração (C) por *Transwell* das células HTR-8/SVneo estimuladas ou não com STAg. Os dados foram expressos como porcentagem do grupo tratado em relação ao controle (100%) \pm erro padrão (*) Comparação entre o grupo controle de células HTR-8/SVneo e grupo tratado com STAg ($p < 0,05$).

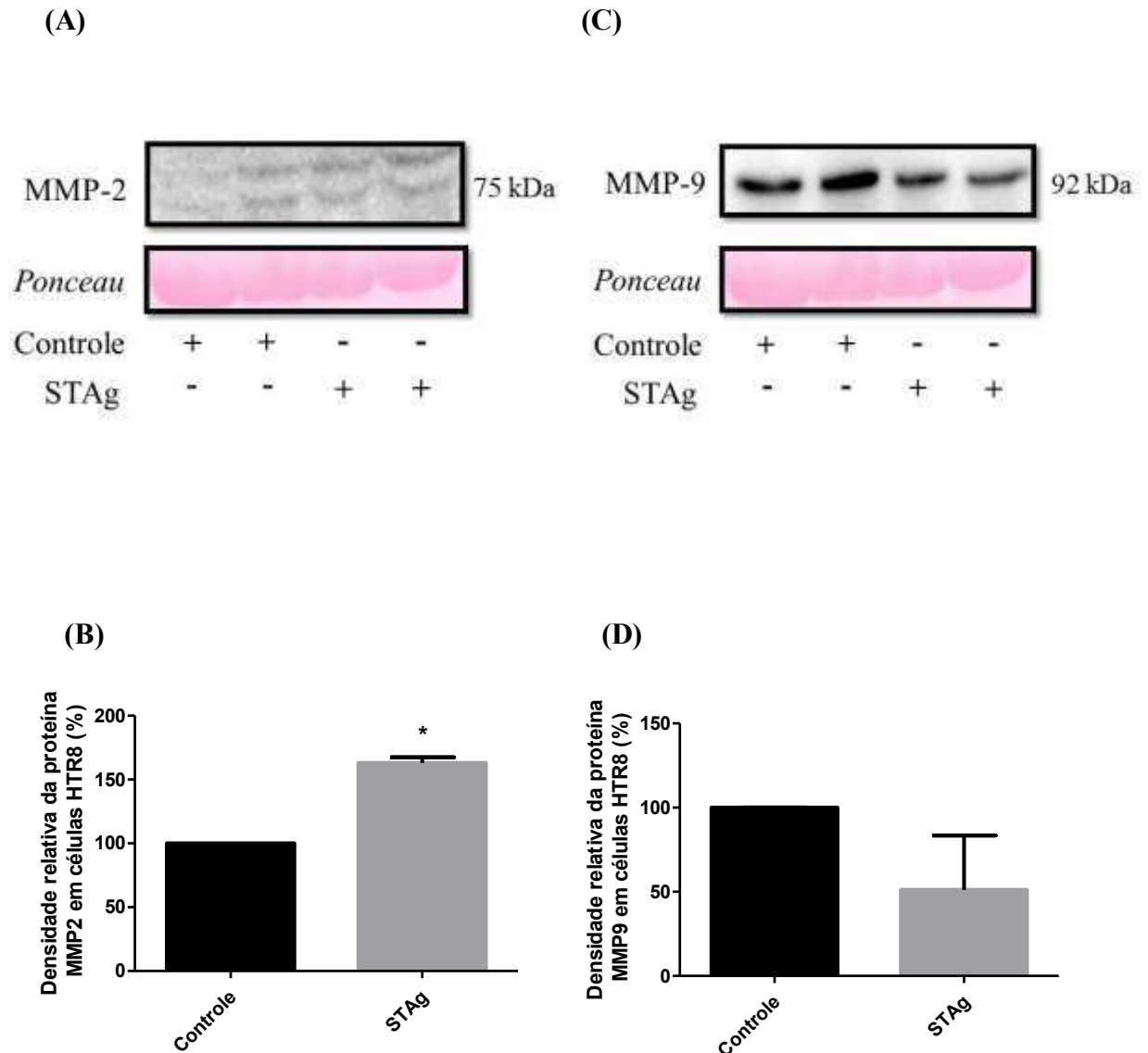
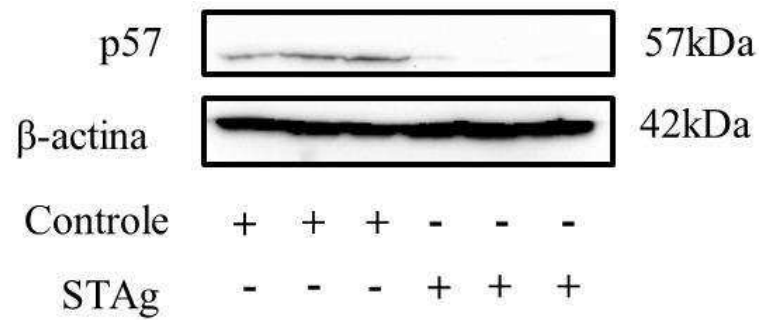


Figura 5. Expressão das proteínas MMP-2 e MMP-9 em células HTR-8/SVneo. Análise por *Western Blotting* da proteína MMP-2 (A) e MMP-9 (C) em células HTR-8/SVneo tratadas ou não com STAg. Membrana corada com *Ponceau*, mostrando a quantidade de proteína total carregada por poço, utilizada como controle endógeno. O gráfico representa os resultados das análises densitométricas das bandas específicas do *Western Blotting* para a MMP-2 (B) e MMP-9 (D). Os dados foram expressos como porcentagem do grupo tratado em relação ao controle (100%) \pm erro padrão. (*) Comparação entre o grupo controle de células HTR-8/SVneo e grupo tratado com STAg ($p < 0,05$).

(A)



(B)

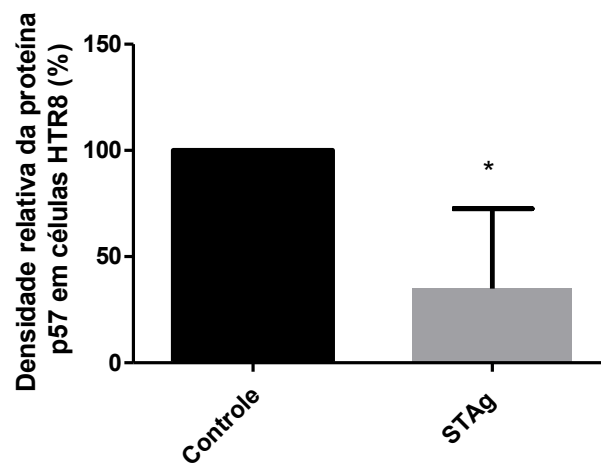


Figura 6. Expressão da proteína p57 em células HTR-8/SVneo. **(A)** Análise por *Western Blotting* da proteína p57 em células HTR-8/SVneo estimuladas ou não com STAg, e β -actina utilizada como controle endógeno. **(B)** O gráfico representa os resultados das análises densitométricas das bandas específicas de p57 do *Western Blotting*. Os dados foram expressos como porcentagem do grupo tratado em relação ao controle (100%) \pm erro padrão. (*) Comparação entre o grupo controle de células HTR-8/SVneo e grupo tratado com STAg ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABAIE, J.; AMIRI, S.; MOSTAFAVI, E.; HASSAN, N.; LOTFI, P.; RASTAGHI, A.R.E.; GOLKAR, M. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Northeast Iran. **Clinical Vaccine Immunology**. v.20, n. 11, p.1771-1773, Nov. 2013.
- BALL, E.; ROBSON, S.C.; AYIS, S.; LYALL, F; BULMER, J.N. Early embryonic demise: no evidence of abnormal spiral artery transformation or trophoblast invasion. **The Journal of Pathology**., v. 208, n. 4, p. 528-534, Mar. 2006.
- BANET, N.; DESCIPIO, C.; MURPHY, K.M.; BEIERL, K.; ADAMS, E.; VANG,R.; RONNETT, B.M. Characteristics of hydatidiform moles: analysis of a prospective series with p57 immunohistochemistry and molecular genotyping. **Modern Pathology**, v. 27, n. 2, p. 238–254, Fev. 2014.
- BARBOSA, I.R.; HOLANDA, C.M.C.X.; ANDRADE-NETO, V.F. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 377-382, Apr. 2009.
- BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; PENA, J.D.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-30, Jul. 2007.
- BARBOSA, B.F. SILVA, D.A.O.; 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. **Clinical Experimental Immunology**., v. 151, n. 3, p. 536-45, Mar. 2008.
- BARBOSA, B.F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A.O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-62, Mar. 2014.
- BARENCO, P.V.C. Papel de HSP70 de *Toxoplasma gondii* como antígeno vacinal e como ferramenta diagnóstica de toxoplasmose em camundongos BALB/c e C57BL/6. 2013. 81f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas na Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2013.
- BAUER, S.; POLLHEIMER, J.; HARTMANN, J.; HUSSLEIN, P.; APLIN, J.D.; KNÖFLER, M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of

plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 89, n. 2, p.812-822, Feb. 2004

BECKERS CJ, DUBREMETZ JF, MERCEREAU-PUJALON O, JOINER KA. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. **Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 947-961. Nov. 1994.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; **Pathology of human placenta**, 4. ed. New York: Spriger, 941 p. 2000.

BENIRSCHKE, K.; BURTON, G.J.; BAERGEN, R.N. **Pathology of the Human Placenta**, 6.ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 941 p. 2012.

BERMUDES, D.; DUBREMETZ, J.F.; ACHBAROU, A.; JOINER, K.A. Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 68, n. 2, p. 247-257. Dec. 1994.

BILBAN, M.; GHAFFARI-TABRIZI, N.; HINTERMANN, E.; BAUER, S.; MOLZER, S.; ZORATTI, C.; MALLI, R.; SHARABI, A.; HIDEN, U.; GRAIER, W.; KNÖFLER, M.; ANDREAE, F.; WAGNER, O.; QUARANTA, V.; DESOYE, G. Kisspeptin-10, a kiss 1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. pt8, p. 1319-1328, Mar. 2004.

BIONDI, C.; FERRETI, M.E.; PAVAN, B.; LUNGHI, L.; GRAVINA, B.; NICOLOSO, M.S.; VESCE, F.; BALDASSARRE, G. Prostaglandin E2 inhibits proliferation and migration of HTR-8/SVneo cell, a human trophoblast-derived cell line. **Placenta**, v. 27, n.6-7, p. 592-601, Jun-Jul., 2006.

BISCHOF, P.; MEISSER, A.; CAMPANA, A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion: a review. **Placenta**, v. 21 Suppl A, p. S55-60, Jan. 2000.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 5-6, p. 458-76, 5 May. 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and senditive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, May. 1976.

BREJCHOVA, K.; LISKOVA, P.; HRDLICKOVA, E.; FILIPEC, M.; JIRSOVA, K. Matrix metalloproteinases in recurrent corneal melting associated with primary Sjörge's syndrome. **Molecular Vision Journal Impact & Description**, v. 15, p. 2364-72, Nov. 2009.

BROOKS, D.E.; OLLIVIER, F.J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice Journal**, v. 34, n. 3, p. 611-22, May. 2004.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics & Gynecology**., v.213, suppl. 4, S6,1, S6-8, Oct., 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>. Acesso em: 10 jun., 2016.

BURROWS, T.D.; KING, A.; LOKE, Y.W. Trophoblast migration during human placental implantation. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 4, p. 307-21, Jul-Aug. 1996.

BUTEL, J. S. Simian virus 40, poliovirus vaccines and human cancer: research progress versus media and public interests. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 2, p. 195-198. 2000.

CALVI, L. M. Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1068, p. 477-88, 6 abr. 2006.

CARELLOS, E.V.M.; CAIAFFA, W.T.; ANDRADE, G.M.Q; ABREU, M.N.; JANUÁRIO, J.N. Congenital toxoplasmosis in the state of Minas a Gerais, Brazil: a neglected infectious disease? **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 3, p. 644-55, Mar. 2014a.

CARELLOS, E.V.M.; ANDRADE, G.M.Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; JANUÁRIO, J.N.; ROMANELLI, R.M.C.; ABREU, M.N.S.; SILVA, F.M.; LOURES, I.R.C.; ANDRADE, J.Q.; CAIAFFA, W.T. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital Toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88588. 2014b.

CARRUTHERS, V.B.; TOMLEY, F.M. Microneme proteins in Apicomplexans. **Subcellular Biochemistry**, v. 47, p. 33-45, 2008.

CASTRO, A.S.; ALVES, C.M.; ANGELONI, M.B.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240-247, Mar. 2013.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83-9, Fev. 2007.

CHAKRABORTY, C.; GLEESON, L.M.; MCKINNON, T.; LALA, P.K. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 116-124, Feb. 2002.

CHAKRABORTY, C.; BARBIN, Y.P.; CHAKRABARTI, S.; CHIDIAC, P.; DIXON, S.J.; LALA, P.K. Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of $[Ca^{2+}]_i$ and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 201, n. 1-2, p. 63-73. Mar. 2003.

CHAN, S.Y.; SUSARLA, R.; CANOVAS, D.; VASILOPOULOU, E.; OHIZUA, O.; MCCABE, C.J.; HEWISON, M.; KILBY, M.D. Vitamin D promotes human extravillous trophoblast invasion in vitro. **Placenta**, v. 36, n. 4, p. 403-409, Apr. 2015.

CHAMLEY, L.W.; HOLLAND, O.J.; CHEN, Q.; VIAL, C.A.; STONE, P.R.; ABUMAREE, M. Review: where is the maternofetal interface? **Placenta**, v.35, suppl. S74-80, Feb. 2014.

CHAUDHRY, S. A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Canadian Family Physician**, v. 60, n. 4, p. 334-6, Apr. 2014.

CHEN, K; HSU, S; CHEN, H; NG, K; CHEN, T. Utility of fluorescence in situ hybridization for ploidy and p57 immunostaining in discriminating hydatidiform moles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.446, n.2; p.555-560, Mar. 2014.

CHING, X.T.; LAU, Y.L.; FONG, M.Y.; NISSAPATORN, V. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant dense granular protein (GRA2) for serodiagnosis by western blot. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1229-1236. Mar. 2013.

COHEN, M; MEISSER, A; BISCHOF, P. Metalloproteinases and human placenta invasiveness. **Placenta**. v.27, n.8, p.783-793, 2006.

COLE, C. N. Polyomavirinae: the viruses and their replication. In.: Fields Virology. BERNARD N FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1997-2020, 1996.

CROSS, J.C. How to make a placenta: Mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - review. **Placenta**. v. 26, Suppl. A, S3–S9. 2005.

DA COSTA, A. Avaliação da imunidade e proteção induzida em modelos experimentais por extrato solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiado por ^{60}CO . 2013. 102f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 893-8, Out. 2009.

DARD, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M.; PELLOUX, H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p.492-506, Jun. 2016.

DE FALCO, M.; FEDELE, V.; COBELLIS, L.; MASTROGIACOMO, A.; GIRALDI, D.; LEONE, S.; DE LUCA, L.; LAFORGIA, V.; DE LUCA, A. Pattern of expression of cyclin D1/CDK4 complex in human placenta during gestation. **Cell and Tissue Research**, v. 317, n. 2, p. 187-94, Ago. 2004.

DUBEY, J. P. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 946-9, Out. 1997.

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 6, p. 1279-82, Dez. 1998.

DUBEY, J.P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 215–219, 2001.

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

DUBEY, J. P.; HILL D.E., ROZEBOOMB D.W.; RAJENDRANA, C.; CHOUDHARYA, S., FERREIRAA, L.R., KWOKA, O.C.H., SUC, C.. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, Sep. 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. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-99, Apr. 1998.

DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 4, p. 841-8, Apr. 2007.

FERRO, E.A.V.; BEVILACQUA, E. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Journal of Morphology**, v.221, n. 2, p. 139-152, Aug. 1994.

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

FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D. A. O.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.R. Macrophage migration inhibitory

factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **American Journal of Pathology**, v. 172, n.1, p. 50-58, Jan. 2008.

FEST, S.; ALDO, P.B; ABRAHAMNS, V.M.; VISINTIN, I.; ALVERO, A.; CHEN, R.; CHAVEZ, S.L.; ROMERO, R.; MOR, G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory net work for the protection of pregnancy. **American Journal Immunology**, v. 57, n. 1, p. 55-66, Jan. 2007.

FITZGERALD, J.S.; POEHLMANN, T.G.; SCHLEUSSNER, E.; MARKERT, U.R. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Human Reproduction Update.**, v. 14, n. 4, p. 335-344, Aug. 2008.

FUKUNAGA, M. Immunohistochemical characterization of p57(KIP2) expression in early hydatidiform moles. **Human Pathology**, v. 33, n. 12, p. 1188-92, Dec. 2002.

GATHIRAM, P.; MOODLEY, J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 27, n. 2, Mar-Apr. 2016.

GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanism, functions and clinical perspectives. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 6, p. 445-453, Nov. 2007.

GENBACEV, O.; MILLER, R. K. Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models-a review. **Placenta**, v. 21 Suppl A, p. S45-9, 6 jan. 2000.

GOLDMAN, S.; WEISS, A.; EYALI, V.; SHALEV, E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9 in the fetal membranes and decidua, associated with labour, **Molecular Human Reproduction**, v.9, n.6, p. 367-373, 2003.

GOLDMAN-WOHL, D.; YAGEL, S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 233-8, Feb. 2002.

GOMES, A. O. Papel de MIF (Fator de Inibição de Migração de Macrófagos) na proteção de células trofoblásticas (BeWo) e explantes placentários de terceiro trimestre contra infecção por *Toxoplasma gondii*. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Uberlândia, 2008.

GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU, L. R.; 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. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, Jun., 2011.

GORDON, G.M.; LEDEE, D.R.; FEUER, W.J.; FINI, M.E. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 2, p. 402-11, Nov. 2009.

GRAHAM, C. H.; HAWLEY, T.S.; HAWLEY, R.G.; MACDOUGALL, J.R.; KERBEL, R.S.; KHOO, N.; LALA, P.K. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. **Experimental Cell Research**, v. 206, n. 2, p. 204-11, Jun 1993.

GUDE, N.M.; ROBERTS, C.T.; KALIONIS, B.; KING, R.G. Growth and the functions of normal human placenta. **Thrombosis Research**, v.114, n.5-6, p. 397-407, 2004.

GUIRELLI, P.M.; ANGELONI, M.B.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; FRANCO, P.S.; SILVA, R.J.; OLIVEIRA, J.G.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; FERRO, E.A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v.36, n.10, p.1106-14, Oct. 2015.

GUPTA, M.; VANG, R.; YEMELYANOVA, A.V.; KURMAN, R. J.; LI, F. R.; MAAMBO, E. C.; MURPHY, K. M.; DESCIPIO, C.; THOMPSON, C. B.; RONNETT, B. M. Diagnostic reproducibility of hydatidiform moles: ancillary techniques (p57 immunohistochemistry and molecular genotyping) improve morphologic diagnosis for both recently trained and experienced gynecologic pathologists. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 12, p. 1747-1760, Dec. 2012.

HAMMER, A. Immunological regulation of trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 90, n. 1, p. 21-28, Jun. 2011.

HANDSCHUH, K.; GUIBOURDENCHE, J.; TSATSARIS, V.; GUESNON, M.; LAURENDEAU, I.; EVAIN-BRION, D.; FOURNIER, T. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 5011-9, Oct. 2007.

HAJAGOS, B.E.; TURETZKY, J.M.; PENG, E.D.; CHENG, S.J.; RYAN, C.M.; SOUDA, P.; WHITELEGGE, J.P.; LEBRUN, M.; DUBREMETZ, J.F.; BRADLEY, P.J.; Molecular dissection of novel trafficking and processing of the *T. gondii* rhoptry metalloprotease Toxolysin-1. **Traffic Journal** v. 13, n. 2, p. 292-304, Feb. 2012.

HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 3, p. 141-9, Mar. 2015.

HOCHEGGER, H.; DEJSUPHONG, D.; SONODA, E.; SABERI, A.; RAJENDRA, E.; KIRK, J.; HUNT, T.; TAKEDA, S. An essential role for Cdk1 in S phase control is revealed via chemical genetics in vertebrate cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 2, p. 257-68, 1 jul. 2007.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-78, Nov. 2012.

IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Starvation of low-density lipoprotein-derived cholesterol induces bradyzoite conversion in *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 248, Jan. 2014.

ILEKIS, J.V.; TSILOU, E.; FISHER, S.; ABRAHAMS, V.M.; SOARES, M.J.; CROSS, J.C.; ZAMUDIO, S.; ILLSLEY, N.P.; MYATT, L.; COLVIS, C.; COSTANTINE, M.M.; HAAS, D.M.; SADOVSKY, Y.; WEINER, C.; RYTTING, E.; BIDWELL, G. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: an executive workshop summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 215, Suppl.1, S1-S46, Jul. 2016.

INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. Cell cycle regulation in plant development. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 77-105, Jan. 2006.

ISAKA, K.; USUDA, S.; ITO, H.; SAGAWA, Y.; NAKAMURA, H.; NISHI, H.; SUZUKI, Y.; LI, Y.F.; Takayama, M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts, **Placenta**, v. 24, n. 1, p. 53-64, 2003.

Ji, L.; BRKIC, J.; LIU, M.; FU, G.; PENG, C.; WANG, Y. L. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 5, p. 981-1023, Oct., 2013.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 1-7, Aug. 2003.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-56, 2005.

KAY, D.; NELSON, M.; WANG, Y. The Placenta: From Development to Disease. 1.ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 360 p. 2011.

KHAMMARI, I.; SAGHROUNI, F.; LAKHAL, S.; BOUGMIZA, I.; BOURATBINE, A.; SAID, M.B.; BOUKADIDA, J. Identification of soluble and membrane antigenic markers of

acquired toxoplasmosis by immunoblot. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 12, p. 684-693. Dec. 2014.

KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2-3, p. 269-80, Jan. 2010.

KO, H.S.; PARK, B.J.; CHOI, S.K.; KANG, H.K.; KIM, A.; KIM, H.S.; PARK, I.Y.; SHIN, J.C. STAT3 and ERK signaling pathways are implicated in the invasion activity by oncostatin M through induction of matrix metalloproteinases 2 and 9. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 3, p. 761-768, May. 2016.

KOCARSLAN, S.; INCEBIYIK, A.; GULDUR, M.E.; EKINCI, T.; OZARDALI, H.I. **J Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 41, n. 7, p. 1018-22, Jul. 2015.

KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **Journal Français d'Ophtalmologie**, v. 33, n. 5, p. 362-367, May. 2010.

KODYM, P.; MALY, M.; BERAN, O.; JILICH, D.; ROZSYPAL, H.; MACHALA, L.; HOLUB, M. Incidence, immunological and clinical characteristics of reactivation of latent *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. **Epidemiology & Infection**, v.143, n. 3, p. 600–607, Feb. 2015.

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

KORGUN, E. T.; CAYLI, S.; ASAR, M.; DEMIR, R. Distribution of Laminin, Vimentin and Desmin in the Rat Uterus during Initial Stages of Implantation. **Journal of Molecular Histology**, v. 38, n. 4, p. 253-60, 2007.

LALA, P. K.; GRAHAM, C. H. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 9, n. 4, p. 369-79, Dec. 1990.

LALA, P. K.; HAMILTON, G. S. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. **Placenta**, v. 17, n. 8, p. 545-55, Nov. 1996.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V.B. *Toxoplasma gondii*: toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 177, n. 1, p. 49-56, May. 2011.

LASH, G.E.; OTUN, H.A.; INNES, B.A.; KIRKLEY, M.; DE OLIVEIRA, L.; SEARLE, R.F.; ROBSON, S.C.; BULMER, J.N. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell

invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. **FASEB Journal**, v. 20, p.2512–2518, 2006.

LI, Y.; KLAUSEN, C.; ZHU, H.; LEUNG, P.C. Activin a increases human trophoblast invasion by inducing SNAIL-mediated MMP2 up-regulation through ALK4. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 11, p. 1415-27, Nov. 2015.

LILLY, M. A.; DURONIO, R. J. New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2765-75, Apr. 2005.

LIM, G.P.; RUSSELL, M.J.; CULLEN, M.J.; TOKES, Z.A. Matrix metallopro-teinasas in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 4, p. 1606-1611, Apr. 1997.

LINDSAY, D.S; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v.138, n.14, p. 1829-3, Dec. 2011.

LIU, H; MUB, X.; LUO, X.; XIAO, Y.; DING, N.; YIN, Q.; DENG, H.; Qi. Expression of Gadd45a in human early placenta and its role in trophoblast invasion. **Placenta**, v.35, n. 6, p. 370-377, Jun 2014.

LOKE, Y. W.; KING, A.; BURROWS, T. D. Decidua in human implantation. **Human Reproduction**, v. 10, Suppl 2, p. 14-21, Dec. 1995.

LOPES AP, DUBEY JP, MOUTINHO O, GARGATÉ MJ, VILARES A, RODRIGUES M, CARDOSO, L. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in women from the North of Portugal in their childbearing years. **Epidemiology & Infection**, v. 140, n. 5, p. 872-877, May. 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75. Nov. 1951.

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3352-3357, Jul. 2003.

MA, G.; ZHANG, J.; YIN, G.; ZHANG, J.; MENG, X.; ZHAO, F. *Toxoplasma gondii*: Proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 41-46, May, 2009.

MA, J.; LI, J.; YANG, S.; HUANG, K.; DONG, X.; SUI, C.; ZHANG, H. P57 and cyclin G1 express differentially in proliferative phase endometrium and early pregnancy decidua. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 4, p. 5144-5149, 2015.

MACAULEY, A.; CROSS, J.C.; WERB, Z. Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. **Molecular Biology of the Cell**. v. 9, n. 4, p. 795-807, Apr. 1998.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. **Physiological Reviews**. v. 83, n. 2, p. 337-76, 2003.

MARTINDILL, D. M.; RILEY, P. R. Cell cycle switch to endocycle: the nucleolus lends a hand. **Cell Cycle**, v. 7, n. 1, p. 17-23, Jan. 2008.

MATSUOKA, S.; EDWARDS, M.C.; BAI, C.; PARKER, S.; ZHANG, P.; BALDINI, A.; HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. **Genes & Development**, v. 9, n. 6, p. 650-62, Mar. 1995.

MAYHEW, T.M. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know?. **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 229-40, Apr. 2014.

MCCONNELL, T.G.; MURPHY, K.M.; HAFEZ, M.; VANG, R.; RONNETT, B.M. Diagnosis and subclassification of hydatidiform moles using p57 immunohistochemistry and molecular genotyping: validation and prospective analysis in routine and consultation practice settings with development of an algorithmic approach. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 33, n. 6, p. 805-817, Jun. 2009.

MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M.C.; LEAL, G.S.; VIDIGAL, L.H.G.; TÁPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

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

MUNOZ-ZANZI, C.; CAMPBELL, C.; BERG, S. Seroepidemiology of toxoplasmosis in rural and urban communities from Los Rios Region, Chile. **Infection Ecology and Epidemiology**, v.6, p.30597, Mar. 2016. Acesso em: 30/06/2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v6.30597>.

MURPHY, K.M.; DESCIPIO, C.; WAGENFUEHR, J.; TANDY, S.; MABRAY, J.; BEIERL, K.; MICETICH, K.; LIBBY, A.L.; RONNETT, B.M. Tetraploid partial hydatidiform mole: A case report and review of the literature. **International Journal of Gynecological Pathology**. v.31, n. 1, p.73-79, Jan. 2012.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, v. 52, n. 4, p. 255-64. Apr. 2002.

NAM, H.W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal Parasitology** v. 47 (suppl), s29-s37, Oct. 2009.

NAM, H.W.; IM, K.S.; BAEK, E.J.; CHOI, W.Y.; CHO, S.Y. Analysis of antigenic domain of gst fused major surface protein (p30) fragments of *Toxoplasma gondii*. **Korean Journal Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 135-141, Jun. 1996.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10^a ed. São Paulo: Atheneu, p.147-56, 2003.

OLIVEIRA, L.P. *Neospora caninum*: estudo do secretoma e caracterização molecular de três proteínas com domínios Apple. 2013. 249f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia na Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2013.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, G.L.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 691-8, Jun-Jul. 2006.

OSPINA-PRIETO, S.; CHAIWANGYEN, W.; PASTUSCHEK, J.; SCHLEUSSNER, E.; MARKERT, U.R.; MORALES-PRIETO, D.M. STAT5 is activated by Epidermal Growth Factor and induces proliferation and invasion in trophoblastic cells. **Reproductive Sciences**. v.22, n.11, p.1358-66, Nov. 2015.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M.E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, Oct. 2009.

PARKS, W.C.; MECHAM, R.P. MATRIX METALLOPROTEINASES. SAN DIEGO: ACADEMIC PRESS, 357f. 1998.

PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I.R. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 3, p. 159-170, Mar. 2015

PESIN, J. A.; ORR-WEAVER, T.L. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, p. 475-99, Jan. 2008.

POLACHEK, H.; HOLCBERG, G.; POLACHEK, J.; RUBIN, M.; FEINSHTEN, V.; SHEINER, E.; BEN-ZVI, Z. Carrier-mediated uptake of Levofloxacin by BeWo cells, a

human trophoblast cell line. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 281, n. 5, p. 833-8, May. 2010.

POLLHEIMER, J.; HUSSLEIN, P.; KNÖFLER, M. Invasive trophoblasts generate regulatory collagen xviii cleavage products. **Placenta**, v.26, Suppl. A, S42–S45, 2005.

QIU, J.F.; GE, K.; WANG, Y. Research Advances on *Toxoplasma gondii* Proteomics. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases**, v. 33, n. 3, p. 214-218. Jun. 2015.

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

RAPACZ-LEONARD, A.; KANKOFER, M.; LEONARD, M.; WAWRZYKOWSKI, J.; DABROWSKA, M.; RAS, A.; PAZDZIOR-CZAPULA, K.; JANOWSKI, T. Differences in extracellular matrix remodeling in the placenta of mares that retain fetal membranes and mares that deliver fetal membranes physiologically. **Placenta**, v. 36, n. 10, p. 1167-77, Oct. 2015.

RAVID, K.; LU, J.; ZIMMET, J.M.; JONES, M.R. Roads to polyploidy: The megakaryocyte example. **Journal of Cellular Physiology**, v.190, n.1, p. 7–20. Jan. 2002.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L. Immunology of pre-eclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 534-543, Jun. 2010.

RENTY, C.; KANEKO, K.J.; DEPAMPHILIS, M.L. The dual roles of geminin during trophoblast proliferation and differentiation. **Development Biological**, v. 387, n. 1, p. 49–63, Mar. 2014.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SILVA, N.M.; MINEO, J.R.; RODRIGUES J.V. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. **Placenta**. v. 33, n. 9, p. 682-687, Sep. 2012.

RICO-TORRES, C.P.; VARGAS-VILLAVICENCIO, J.A.; CORREA, D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2656-2>. Acesso em: 8 Jun. 2016.

ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 476-488, Jul. 2001.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Abr. 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; MURAT, J.B.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M.P.; GANGNEUX, J.P.; PELLOUX, H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? **Trends Parasitology**, v. 27, n. 12, p. 530-536, Dec. 2011.

ROCHA, E.M.; LOPES, C.W.G.; RAMOS, R.A.N.; ALVES, L.C. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women from the State of Tocantins, Northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.6, p.773-775, Dec. 2015.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458-72, May. 2006.

SALAMONE, G.; FRACCAROLI, L.; GORI, S.; GRASSO, E.; PAPARINI, D.; GEFFNER, J.; PÉREZ LEIRÓS, C.; RAMHORST, R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Human Reproduction**, v. 27, n. 9, p. 2598-606, Set. 2012.

SARKARI, B.; ABDOLAH Khabisi, S. Severe congenital toxoplasmosis: a case report and strain characterization. **Case Reports in Infectious Diseases**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/851085>. Acesso em: 11 Jun. 2015.

SEVAL, Y.; AKKOYUNLU, G.; DEMIR, R.; ASAR, M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. **Acta Histochemica**, v. 106, n. 5, p. 353–362, 2004.

SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual control of trophoblast invasion. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 75, n. 3, p. 341–350, Mar. 2016.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes & Development**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, Jun. 1999.

SHIMAMORI, Y.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, Y. Characterization of gelatinases in human placenta. **Biochemical and Molecular Medicine**, v. 56, p. 84-86, 1995.

SHIMONOVITZ, S.; HURWITZ, A.; DUSHNIK, M.; ANTEBY, E.; GEVA-ELDAR, T.; YAGEL, S. Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 171, n. 3, p. 832–838, 1994.

SIBLEY, L.D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004

SIMMONS, D.G; CROSS, J.C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. **Development Biological**, v. 284, n. 1, p. 12-24, Aug. 2005.

SIVAK,J.M.; FINI, M.E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n. 1, p. 1-14. Jan. 2002.

SOUZA, W.; DUARTE, E.S.M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

STAUN-RAM, E.; SHALEV, E. Human trophoblast function during the implantation process. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 56, 2005.

SYKES, L.; MacIntyre, D.A.; Yap, X.J.; Teoh, T.G.; Bennett, P.R. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 967629, 2012.

TAKAHASHI, H.; TAKIZAWA, T.; MATSUBARA, S.; OHKUCHI, A.; KUWATA, T.; USUI, R.; MATSUMOTO, H.; SATO, Y.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, A.; SUZUKI, M.; TAKIZAWA, T. Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 163-170, Mar. 2014.

TANTBIROJN, P.; CRUM, C.P.; PARAST, M.M. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 639-645, Jul. 2008.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, Nov. 2000.

ULLAH, Z.; KOHN, M.J.; YAGI, R.; VASSILEV, L.T.; DEPAMPHILIS, M.L. Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/kip2 Inhibition of cdk1 activity. **Genes & Development**. v. 22, n. 21, p.3024–3036, Nov. 2008.

ULLAH, Z.; LEE, C.Y.; LILLY, M.A.; DEPAMPHILIS, M.L. Developmentally programmed endoreduplication in animals. **Cell Cycle**. v.8, n.10, p.1501-1509, May. 2009.

UNEK, G.; OZMEN, A.; MENDILCIOGLU, I.; SIMSEK, M.; KORGUN, E.T.; The expression of cell cycle related proteins PCNA, Ki67, p27 and p57in normal and preeclamptic human placentas. **Tissue and Cell**. v.46, n.3, p.198–205, 2014a.

UNEK, G.; OZMEN, A.; OZEKINCI, M.; SAKINCI, M.; KORGUN, E.T. Immunolocalization of cell cycle proteins (p57, p27, cyclin D3, PCNA and Ki67) in intrauterine growth retardation (IUGR) and normal human term placentas. **Acta Histochemistry**, v. 116, n. 3, p. 493-502, Apr. 2014b.

UNEK, G.; OZMEN, A.; MENDILCIOGLU, I.; SIMSEK, M.; KORGUN, E.T. The expression of cell cycle related proteins PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic human placentas. **Tissue and Cell**. v. 46, n.3, p.198-205, June. 2014.

VARANOU, A.; WITHINGTON, S.L.; LAKASING, L.; WILLIAMSON, C.; BURTON, G.J.; HEMBERGER, M. The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development. **Journal of molecular medicine**, v. 84, n. 4, p. 305-17, Apr. 2006.

VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 195–204, Jun. 2016.

VASSILEV, L. T.; TOVAR, C.; CHEN, S.; KNEZEVIC, D.; ZHAO, X.; SUN, H.; HEIMBROOK, D.C.; CHEN, L. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 28, p. 10660-10665, Jul. 2006.

VAZ, R.S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SUMIKAWA, E.; GUIMARÃES, A.T.B. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 661-665. Feb. 2010.

VILLE, Y.; LERUEZ-VILLE, M. Managing infections in pregnancy. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 251-7, Jun. 2014.

WANG, Q.J.; SONG, B.F.; ZHANG, Y.H.; MA, Y.Y.; SHAO, Q.Q.; LIU, J.; QU, X. Expression of RGC32 in human normal and preeclamptic placentas and its role in trophoblast cell invasion and migration. **Placenta**. v. 36, n. 4, p. 350-6, Apr. 2015.

WEISS, A.; GOLDMAN, S.; SHALEV, E. The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes. **Frontiers in Bioscience**. v. 12, p. 649-659, Jan. 2007.

WEISS, L.M.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895-901, Jul. 2009.

YANG, W.; LI, Q.; PAN, Z. Sphingosine-1-phosphate promotes extravillous trophoblast cell invasion by activating MEK/ERK/MMP-2 signaling pathways via S1P/S1PR1 axis activation. **Plos One**. v.9, n. 9, e106725, Sep. 2014.

YANG, Y.; HE, G.; XU, W.; LIU, X. ENaC mediates human extravillous trophoblast cell line (HTR8/SVneo) invasion by regulating levels of matrix metalloproteinase 2 (MMP2). **Placenta**. v.36, n. 5, p. 587-93, May. 2015.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109-21, Feb. 2014.

ZELDOVICH, V.B.; BAKARDJIEV, A.I. Host Defense and Tolerance: Unique Challenges in the Placenta. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 8, e1002804, Aug. 2012.

ZYBINA, T.G.; KAUFMANN, P.; FRANK, H.G.; FREED, J.; KADYROV, M.; BIESTERFELD, S. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization. **Tsitologiya**, v. 44, n. 11, p. 1058-67, Jan. 2002.

ZYBINA, T.G.; ZYBINA, E.V. Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta. **Cell Biology International**, v. 29, n. 12, p. 1071-1083, Dec. 2005.