

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) aumenta a
migração e a susceptibilidade de células trofoblásticas extravilosas
(HTR8/SVneo) à infecção por *Toxoplasma gondii***

ILIANA CLAUDIA BALGA MILIAN

Uberlândia
Fevereiro, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) aumenta a
migração e a susceptibilidade de células trofoblásticas extravilosas
(HTR8/SVneo) à infecção por *Toxoplasma gondii***

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

Aluna: Iliana Claudia Balga Milian

Orientadora: Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia
Fevereiro, 2017

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

M644f
2017

Milian, Iliana Claudia Balga, 1991

Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) aumenta a migração e a susceptibilidade de células trofoblásticas extravilosas (HTR8/SVneo) à infecção por *Toxoplasma gondii* / Iliana Claudia Balga Milian. - 2017.

76 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Células - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.07

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, minha mãe Leslie e meu pai Alberto ,minha tia Mirtha, meus primos José Francisco e Javier Francisco e ao meu amado Paquito. Sou grata todos os dias por ter vocês ao meu lado. Ensinaram-me o valor da vida, a importância dos momentos juntos e saber que, mesmo que os dias sejam difíceis o maior dom que temos é a educação, o amore força de vontade de correr atrás dos nossos sonhos.

Amo vocês!

*“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin*

Agradecimento especial

Agradeço a minha orientadora Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro. Muito obrigada por ter me dado à oportunidade de trabalhar juntamente com você e sua equipe. Agradeço também, a confiança, paciência, dedicação e o carinho. Tenho o maior orgulho de trabalhar com uma professora tão apaixonada por seu trabalho, admiro sua capacidade de sempre colocar em primeiro lugar o amor e a dedicação à pesquisa acima de tudo. Tenho certeza que o meu crescimento pessoal e profissional foi graças à oportunidade de trabalhar estes dois anos juntamente com você.

Agradecimento Fundamental

Agradeço especialmente a minha co-orientadora Dra. Priscila Silva Franco. Primeiramente quero agradecer por não desistir e por sempre apoiar e me incentivar nestes anos de mestrado. “O que seria de mim sem você?” Tenho muito orgulho e estou muito lisonjeada em trabalhar e aprender tantas coisas juntamente com você. Suas cobranças, seu apoio e seu carinho fazem com que hoje eu tenha crescido como pessoa e principalmente como profissional. Espero que um dia eu seja tão boa pesquisadora e professora como você.

Agradecimentos

Agradeço minha família do laboratório: Andressinha, Ana Carolina, Angelica, Bellisa, Camilla, Priscila, Fernanda, Mayara, Pamela e Rafaela. Vocês são tão especiais na minha vida. Aceitaram-me de braços aberto como colega e principalmente como amiga, ensinaram-me o valor da amizade. Mesmo cada uma tendo uma personalidade única, dividimos muitos abraços, beijos, puxões de orelhas, sorrisos, e amor, vocês são pessoas muito especiais! Só tenho agradecimentos a vocês minhas queridas, eu não teria conseguido sem o apoio de todas.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, Lara, Matheus, Guilherme por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos meus amigos da vida por me apoiarem durante tantos anos, Omar, Karine, Maraisa, Marília, Luiza, Tamy, Ana Laura, Natália, Camilla, Thaisa, Lorena, Carolina Ponciano. Tenho certeza que sempre posso contar com vocês!

Aos alunos da professora Neide: Estér e Marcos Paulo. Muito obrigada pelo ensinamento e, principalmente nos momentos que precisei de células e/ou parasitos.

CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro e a FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Gestação e desenvolvimento placentário.....	11
1.2 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) na gestação..	14
1.3 Modos de ação de MIF.....	16
1.4 <i>Toxoplasma gondii</i> :características gerais.....	18
1.5 Toxoplasmose.....	20
1.6 Toxoplasmose congênita.....	21
1.7 MIF e Toxoplasmose.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Cultura de células HTR8/SVneo e BeWo.....	26
4.2 Manutenção do clone 2F1 de <i>T.gondii</i> em cultura.....	27
4.3 Ensaio de MTT.....	28
4.4 Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> nas células HTR8/SVneo sob influência de rhMIF ou ISO.....	29
4.5 Dosagem extracelular de MIF pelas células HTR8/SVneo.....	29
4.6 Expressão de CD44 e fosforilação da ERK 1/2 em células HTR8/SVneo infectadas ou não por <i>T. gondii</i> e tratadas ou não com rhMIF ou ISO	30
4.7 Migração celular.....	32
4.8 Normas de biossegurança.....	33
4.9 Análises estatísticas.....	33
5 RESULTADOS.....	33
5.1 A viabilidade das células HTR8/SVneo não foi alterada após o tratamento e infecção.....	33
5.2 Proliferação intracelular de <i>T.gondii</i> foi maior nas células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF.....	34
5.3 ISO-1 diminuiu a produção de rhMIF, em células infectadas por <i>T.</i> <i>gondii</i>	34

5.4 Células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF expressaram mais CD44 e ERK1/2.....	35
5.5 A migração celular é diminuída após o tratamento com ISO-1.....	35
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÕES.....	42
8 FIGURAS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

O sucesso da gestação é dependente da produção de muitas citocinas. Algumas destas citocinas contribuem para a migração de células trofoblásticas extravilosas, como o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), importante durante esse processo. MIF é uma citocina potente e está envolvida na patogênese de diferentes infecções, incluindo a toxoplasmose. Assim, investigamos o papel de MIF em células trofoblásticas extravilosas, linhagem HTR8/SVneo, após infecção por *Toxoplasma gondii*. As células foram infectadas com taquizoítas da linhagem RH (2F1) de *T. gondii* e tratadas com MIF recombinante (rhMIF) ou inibidor de MIF (ISO-1). A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT, a proliferação intracelular de *T. gondii* pelo ensaio de β -galactosidase colorimétrica, a expressão de CD44 e fosforilação de ERK1/2 por *Western blott* e a migração celular pelo ensaio de *scratch*. Os sobrenadantes foram coletados para análise de produção de MIF por ELISA. As células foram utilizadas para a expressão do co-receptor CD44 e análise da fosforilação de ERK1/2. A viabilidade celular não foi alterada nas células infectadas e/ou tratadas com rhMIF ou ISO-1. As células tratadas com rhMIF apresentaram elevada carga parasitária e maior expressão da fosforilação da ERK1/2. Além disso, a infecção aumentou a produção de MIF extracelular pelas células HTR8/SVneo. Em relação ao ensaio de migração celular, as células tratadas com ISO-1 diminuíram a migração comparadas com as células tratadas com rhMIF. Assim, a infecção por *T. gondii* modula a produção de MIF, a expressão da fosforilação de ERK1/2. Além disso, MIF foi importante na migração de células HTR8/SVneo, garantindo sua permanência na célula hospedeira.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF), CD44, fosforilação da ERK1/2 e migração celular.

ABSTRACT

The successful of pregnancy depend about production of many cytokine by extravillous trophoblastic cells migration and the macrophage migration inhibitory (MIF) is important in this process. MIF is a potent cytokine, implicated in several pathological conditions and it is involved in pathogenesis of infections, including toxoplasmosis. Therefore, we investigated the role of MIF in infected HTR8/SVneo cells. The cells were infected with RH strain (2F1) tachyzoites of *T. gondii* and treated with recombinant MIF (rhMIF) or MIF inhibitor (ISO-1). The cell viability was analyzed by MTT assay, *T. gondii* intracellular proliferation by colorimetric beta-galactosidase assay, CD44 expression and ERK1/2 phosphorylation by Western blotting and cell migration by scratch assay. The supernatants were collected for MIF production analysis by ELISA. The cells were used to CD44 co-receptor and ERK1/2 phosphorylation analysis. Cellular viability was not changed in infected and/or treated with rhMIF or ISO-1. Cells treated with rhMIF showed high parasite burden, presence of ERK1/2 phosphorylation. In addition, the infection increased extracellular MIF production by HTR8/SVneo cells. In cellular migration assay, ISO-1 treated cells decrease migration compared with rhMIF treated cells. In conclusion, *T. gondii* infection caused modulation of MIF production and ERK1/2 phosphorylation. Furthermore, MIF was important in the migration of HTR8/SVneo cells, ensuring its permanence in the host cell.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Macrophage Migration Inhibitor Factor (MIF), CD44, ER1/2 phosphorylation, cell migration.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gestação e desenvolvimento placentário

O sucesso gestacional é dependente de três processos interdependentes - desenvolvimento embrionário e sua implantação, decidualização e a formação da placenta (WINSHIP et al., 2015).

O desenvolvimento embrionário inicia-se pela união do ovócito secundário com o espermatozoide na ampola da tuba uterina, um processo conhecido como fecundação (WASSARMAN et al., 1999). Após a fecundação, o zigoto sofre diversas divisões mitóticas e mudanças morfogênicas até formar o blastocisto (COCKBURN et al., 2010; WANG et al., 2006). Este por si interage fisiologicamente com o endométrio materno iniciando o processo conhecido como implantação embrionária (RED-HORSE et al., 2004; WANG et al., 2006). O processo de implantação é caracterizado por ser altamente dinâmico e corresponde à invasão do blastocisto no endométrico, levando ao estabelecimento de um microambiente adequado para a formação e crescimento do embrião (CHAMLEY et al., 2014, BURTON; JAUNIAUX 2015). Durante a implantação, as células estromais endometriais sofrem diferenciações morfológicas e biológicas, denominando este processo como decidualização (GELLERSEN et al., 2007). Além disso, outro fator crucial para o sucesso da implantação é a tolerância imunológica, caracterizada pelos elevados níveis de citocinas produzidas pelas células estromais endometriais bem como por “natural killer” (células NK), células apresentadoras de antígenos (APS), células dendríticas (DCs) e macrófagos (KÄMMERER et al., 2005). A secreção de citocinas por estas diferentes populações celulares tem um papel importante na mudança de um perfil pro-inflamatório (Th1) para um perfil anti-inflamatório (Th2) (MIYAZAKI et al., 2003).

A decidualização inicia-se durante a fase secretora do ciclo menstrual, e compreende a diferenciação das células estromais endometriais, liberação de fatores de crescimento (DALY et al., 1983), remodelamento vascular, presença de células do sistema imunológico (GELLERSEN et al., 2007) e regulação da migração/invasão e proliferação de células trofoblásticas. Se o processo de decidualização for prejudicado, poderá levar doenças reprodutivas como

infertilidade, aborto, desordens no útero/placenta e endometriose (GELLERSEN et al., 2007; SALKER et al., 2011; BARRAGAN et al., 2016).

As células trofoblásticas são células embrionárias/fetais e são consideradas o principal grupo celular responsável pelo processo de implantação do embrião e formação da parte fetal da placenta; bem como nutrição, proteção (MOORE et al., 1993) e regulação hormonal (FERRO; BEVILACQUA, 1994; FERRO, 2000; CHAMLEY et al., 2014; MAYHEW, 2014).

As células trofoblásticas também exibem outra atividade essencial na modulação, direta ou indireta, do perfil tolerogênico, essencial no período gestacional (CHAOUAT et al., 2010; SALAMONE et al., 2012). Essas células atuam na supressão/regulação de linfócitos T pela secreção de indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO). Além disso, atua na produção de fatores bloqueadores induzidos por progesterona (PIBF), interagindo com receptores das células NK, inibindo ou ativando as mesmas (CHAOUAT et al., 2010); induz um perfil tolerogênico em células dendríticas (SALAMONE et al., 2012); recruta e regula a atividade de monócitos (FEST et al., 2007; CASTRO et al., 2013) e modula a expressão de proteínas por macrófagos (ABUMAREE et al., 2012), sendo estes importantes no suporte da invasão do trofoblasto, no remodelamento vascular, na implantação e na placentação (NAGAMATSU; SCHUST, 2010).

Durante o processo de implantação, o trofoblasto que circunda externamente o blastocisto se diferencia e passa a apresentar propriedades e funções distintas. Essas células passam a ser denominadas de trofoblásticas (HUPPERTZ et al., 2006). O citotrofoblasto se diferencia em duas subpopulações: sinciotrofoblasto, que são células multinucleadas responsáveis pelo transporte de nutrientes, produção de alguns hormônios e o revestimento dos vilos flutuantes; e o trofoblasto extraviloso, responsável pela migração/invasão da decídua e remodelamento das arteríolas espiraladas através da substituição das células endoteliais dos vasos (KLIMAN et al., 2000). Dessa forma, o sucesso gestacional depende da implantação do blastocisto no endométrio decidualizado e sua interação principalmente com as células trofoblásticas (KLIMAN et al., 2000; LOKE; KING; BURROWS, 1995; SALAMONE et al., 2012).

As células trofoblásticas extravilosas possuem vários subtipos presentes na decídua, dependendo de sua localização: trofoblasto extraviloso intersticial (TEVi), os quais são mononucleares, presentes no mesênquima decidual; e

trofoblasto extraviloso endovascular (TEVe) presentes no revestimento vascular (LYALL et al., 2013), os quais estão diretamente associados com as artérias espiraladas, remodelando-as e aumentando o diâmetro do vaso e diminuindo a resistência de fluxo sanguíneo de forma a permitir um maior fluxo de sangue para o espaço intervilo, e consequentemente, levando uma abundância de nutrientes para a interface materno-fetal (REDMAN; SARGENT, 2010; CHAMLEY et al., 2014; GATHIRAM; MOODLEY, 2016). A migração/invasão do trofoblasto extraviloso é estimulada pela secreção de citocinas e quimiocinas pelas células decíduais (IWAHASHI et al., 1996), tendo estas a capacidade de controlar rigorosamente essa migração/invasão do trofoblasto extraviloso, para que não ultrapasse os limites da decídua e não cause patologias durante a gestação (LALA; HAMILTON, 1996; BISCHOF; MEISSER; CAMPANA, 2000; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016).

Alterações no processo de migração/invasão das células trofoblásticas extravilosas ou o não remodelamento das artérias espiraladas pode levar a consequências graves para a gestante e para o feto (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Uma capacidade diminuída na invasão do trofoblasto pode ocasionar complicações gestacionais como pré-eclâmpsia (LAYALL et al., 2001; KAUFMANN et al., 2003) ou restrição do crescimento intrauterino (JI et al., 2013). A pré-eclâmpsia afeta de 2-8% de todas as gestantes e é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade materno-fetal do mundo (CARDAROPOLI et al., 2014). Ela tem como característica principal um remodelamento incompleto das artérias espiraladas levando a um quadro de hipoperfusão e, consequentemente, diminuição de nutrientes para o feto, sendo em alguns casos fatal (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Por outro lado, um excessivo processo de migração/invasão pode estar relacionado ao desenvolvimento da placenta acreta, quando a placenta ultrapassa o miométrio (CHAKPABORTY et al., 2002). Na placenta humana, células trofoblásticas são banhadas diretamente pelo sangue materno. Este órgão é dividido em duas regiões: a placa coriônica (parte fetal) e a decídua basal (parte materna). Entre elas se encontra o espaço intervilo, no qual os vilos flutuantes estão em contato com o sangue materno (BERNIRSCHKE; 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). Por fim, a placenta é o único órgão transitório associado com a interação materno-fetal (TAKAO et al., 1990), proporcionando suporte para o crescimento e desenvolvimento do feto durante o processo gestacional, secreção hormonal (LOKE; KING; BURROWS, 1995), fornecendo nutrientes, oxigênio, ajudando na excreção (BENIRSCHKE et al., 2006) e proteção contra patógenos (POLACHEK et al., 2010). Além disso, possibilita a formação de um microambiente de tolerância imunológica necessária para o sucesso gestacional (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011).

1.2 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) na gestação

O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é uma citocina que foi descoberta na década de 60 por David (1966); Blomm e Bennett (1966), inicialmente definida como uma substância que inibia a migração de células peritoneais normais, presumivelmente macrófagos (WEISER et al., 1989, LUBETSKY et al., 2002). Esta citocina foi identificada como um fator produzido e liberado por linfócitos, na presença de antígenos, em resposta a uma reação imunológica específica (DAVID, 1966), e é associada com a inibição de migração randômica de macrófagos durante resposta de hipersensibilidade tardia (WEISER et al., 1989). Apesar de MIF ter sido a primeira citocina a ser descoberta, foi negligenciada por um longo tempo (NGUYEN et al., 2003). Suas atividades biológicas só foram esclarecidas através da clonagem do DNA complementar de MIF humano em 1989 (CALANDRA; ROGER, 2003).

MIF atua em processos pró-inflamatórios e é secretado por linfócitos sensibilizados (UNDURTI, 2000, VERAX et al., 2003) e age também como imunomodulador (CALANDRA; ROGER, 2003). Devido ao seu papel regulador, é sugerido que MIF atue no sistema endócrino e imunológico, uma vez que Calandra e Roger (2003) observaram a sua liberação por células da hipófise anterior em resposta ao estímulo de endotoxinas, sendo também produzido, estocado e liberado por células da imunidade inata.

Existem evidências do envolvimento de MIF em inúmeras atividades fisiológicas, como sua participação em diversas doenças e reações inflamatórias como artrite reumatóide (LEECH et al., 2003; ONODERA et al., 2004), infarto do miocárdio (YU et al., 2003), sepse (BOZZA et al., 1999; CALANDRA et al.,

2000), colite (OHKAWARA et al., 2005), asma (MIZUE et al., 2005), desenvolvimento de tumores (WILSON et al., 2005), bem como o seu envolvimento em processos reprodutivos em geral como ovocitação (WADA et al., 1997), ciclo menstrual (ARCURI et al., 2001) e fase inicial da gestação (ARCURI et al., 1999).

Essa citocina já foi detectada em ovário, oviduto, no útero e principalmente no endométrio (SUZUKI et al., 1996). MIF também pode ser encontrado na gravidez precoce em células do estroma pré-decidualizado (SUZUKI et al., 1996; KLEIN, TROEDSSON, 2013; ARCURI et al., 2001). Além disso, MIF é expresso em altas quantidades em tecidos humanos em estágios de pré-implantação e durante a implantação embrionária (ARCURI et al., 1999, ARCURI et al., 2001).

Na placenta, essa citocina é expressa principalmente pelo citotrofoblasto de vilos flutuantes, em vilos de ancoragem e também pelo trofoblasto extraviloso (ARCURI et al., 1999). Níveis de MIF na placenta são maiores nos primeiros estágios da gestação e diminuem no terceiro trimestre (IETTA et al., 2007). Além disso, outros estudos mostraram que a diminuição dos níveis de MIF no soro materno estão associadas à abortos no primeiro trimestre de gestação (YAMADA et al., 2003).

No espaço interviloso estão presentes as células mononucleares, as quais produzem maior quantidade de MIF em comparação com as células mononucleares do sangue periférico (CHASARANEEYKORN et al., 2002). Quando ocorre o aumento da produção desta citocinas na placenta durante uma reação inflamatória, haverá um acúmulo de macrófagos e monócitos no espaço interviloso (SUGUITAN et al., 2003; PFAFF et al., 2005). Possivelmente, altos níveis de MIF no sangue interviloso pode cumprir um importante papel na ativação de macrófagos (CHASARANEEYKOR et al., 2002). Todos estes dados sugerem que MIF seja uma citocina chave envolvida na implantação embrionária e durante a gestação (ARCURI et al., 1999).

Além de sua importante função durante uma gestação, estudos prévios demonstraram que MIF participa na indução da resposta inflamatória contra patógenos como vírus, bactérias e parasitos protozoários (CALANDRA et al., 1995; BERNHAGEN et al., 1993; FERRO et al., 2008; GOMES et al., 2013). Depois da liberação nos tecidos ou na circulação sistêmica, MIF atua como uma

citocina pró-inflamatória clássica, promovendo a resposta inata e adquirida através da ativação dos macrófagos e das células T (CALANDRA; ROGER, 2003).

Diante da participação do MIF em diversas alterações patológicas, fisiológicas e imunológicas, foram desenvolvidos inibidores dessa citocina como possíveis estratégias terapêuticas. Dentre estes inibidores, ISO-1 ((S,R)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5 isoxazol ácido acético metil éster) é um inibidor altamente específico de MIF (AL-ABED et al., 2005; AL-ABED et al., 2011). Al-Abed e colaboradores (2011) desenvolveram pequenas moléculas inibidoras de MIF, tendo à maioria dos inibidores a capacidade de se ligarem dentro do sítio catalítico contendo aminoácidos altamente conservados, sendo estes essenciais para a atividade pró-inflamatória de MIF. Este inibidor tem efeitos benéficos em diversas doenças como colite (SHAH et al., 2008), neurite alérgica (NICOLETTI et al., 2005) e na endotoxemia (AL-ABED et al., 2005) levando a uma diminuição das atividades de MIF em várias doenças (AL-ABED et al., 2011).

1.3 Modos de ação de MIF

Leng e colaboradores (2003) identificaram que MIF exerce suas ações através da ligação com seu receptor/co-receptor alvo, promovendo uma resposta celular como ativação de vias de sinalização, transcrição genética e expressões moleculares.

O primeiro receptor de MIF a ser identificado na superfície celular foi CD74. MIF se liga ao CD74 com alta afinidade (LENG et al., 2003) e, para desencadear uma via de sinalização intracelular, é necessário a presença de co-receptores como CD44, CXCR2, CXCR4 ou CXCR7 (SHI et al., 2006; BERNHAGEN et al., 2007; TARNOWSKI et al., 2010). MIF quando se liga ao seu receptor/co-receptor, CD74 e CD44 respectivamente, induzirá, subsequentemente, várias respostas celulares como a ativação de proteínas intracelulares da família das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), dentre elas a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) 1 e 2 (MITCHELL et al., 1999, LUE et al., 2011). Estudos prévios mostraram que MIF fosforila ERK1/2 em fibroblastos humanos, o mesmo se observa para as células trofoblásticas vilosas (BeWo) (BARBOSA

et al., 2014), e este efeito é inversamente correlacionado a dose (MITCHELL et al., 1999; LUE et al., 2006). A fosforilação da ERK1/2 ativa uma série de proteínas citosólicas, incluindo fosfolipase A2 (PLA2). PLA2 promove a liberação do ácido araquidônico da membrana plasmática, levando à síntese de prostaglandinas e leucotrienos, tais como prostaglandina E2 (PGE2), através da indução deciclooxygenases (COX), especialmente COX-2 (LENG et al., 2006). Nos seres humanos, a PGE2 é um mediador lipídico envolvido em várias funções reprodutivas incluindo a implantação do blastocisto, decidualização das células estromais endometriais e iniciação do trabalho de parto, levando a contratilidade do miométrio (CHALLIS et al., 2002). Apesar de muitos estudos descreverem PGE2 como uma molécula pró-inflamatória, vários estudos demonstraram o papel imunossupressor dela, como a mudança significativa de um perfil Th1 para um perfil Th2 (LI et al., 2006; MILLER et al., 2006). Nesse sentido, estudos anteriores demonstraram que a PGE2 pode ser usada como mecanismo de escape de alguns patógenos, como *Cryptococcus neoformans*, uma vez que este mediador lipídico favoreceu a persistência da infecção em células T murinas (VALDEZ et al., 2012). Além disso, estudos prévios de nosso grupo demonstraram que MIF desencadeou uma via de sinalização através da fosforilação da ERK1/2 em células trofoblásticas humanas da linhagem BeWo, levando a produção da PGE2 e favorecendo a proliferação de *Toxoplasma gondii* (BARBOSA et al., 2014). Portanto, mais uma vez podemos enfatizar a importância de MIF em processos inflamatórios na interface materno-fetal e sistemicamente, especialmente na presença de patógenos como *T. gondii*. Neste sentido, investigar as funções de MIF no trofoblasto humano na presença de *T. gondii* é de extrema importância para compreender esta interação e assim estabelecer novos conhecimentos que alavanquem o desenvolvimento de formas alternativas de prevenir ou minimizar a toxoplasmose congênita, que é um problema de saúde pública em vários países do mundo, incluindo o Brasil (DUBEY et al., 2012).

1.4 *Toxoplasma gondii*: características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa (DUBEY et al., 2010), Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidida e Família Sarcocystidae (KAWAZOE, 2005). Este protozoário compreende um grupo diverso de parasitos intracelulares que infectam vários hospedeiros e ocasionalmente causam doença grave em humanos e animais (HUNTER; SIBLEY, 2012). Este protozoário foi identificado simultaneamente no Brasil por Splendore, em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), e por Nicole e Manceaux, no Norte da África, em um roedor (*Ctenodactylus gundi*), ambos em 1908 (KAWAZOE et al., 2005). *T. gondii* é caracterizado pela presença do complexo apical composto de organelas secretórias especializadas como roptrias, micronemas e grânulos densos; e de elementos do citoesqueleto, dentre eles, o conoide, anéis polares e microtúbulos subpeliculares (SOLDATI; MEISSNER, 2004; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Essa estrutura típica do parasito é fundamental no processo de adesão e invasão nas células hospedeiras e também para sua sobrevivência (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; BLADER; SAEIJ, 2009).

T. gondii possui três formas evolutivas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (DUBLEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os taquizoítas possuem uma forma arqueada e representam a única forma de multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira e são as formas predominantes na fase aguda da infecção. Nessa fase, os parasitos são disseminados, principalmente, pelo sistema circulatório e têm a capacidade de infectar diversos órgãos e tecidos (DUBLEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004), tais como placenta (DESMONTS et al., 1981), tecido muscular esquelético e cardíaco, e região ocular (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012; HARKER; UENO; LODOEN, 2015). A rápida disseminação dos parasitos está relacionada à capacidade destes em infectar células do sistema imunológico que exercem funções migratórias como monócitos, linfócitos e células dendríticas (LAMBERT et al., 2006; SIBLEY, 2011).

Os bradizoítas resultam da conversão de taquizoítas em um estágio de multiplicação lenta do parasito, sendo típicos da fase crônica da infecção (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002), podendo permanecer viáveis no interior dos cistos por toda a vida do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Os cistos contendo bradizoítas são distribuídos em tecidos do hospedeiro, sendo mais frequentes nos músculos esqueléticos e cardíacos, tecido nervoso e região ocular (DUBEY, 1998; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012; KAMERKAR; DAVIS, 2012). Se o *status* imunológico for comprometido, inicia-se um processo de reagudização da infecção e podem retornar à forma de taquizoítas e apresentar uma rápida multiplicação (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; HARKER; UENO; LODOEN, 2015), mas não havendo distúrbios no sistema imunológico, esta fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (ELSHEIKHA, 2008).

Os esporozoítas são encontrados em oocistos liberados nas fezes de felídeos, os hospedeiros definitivos do parasito (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Estes correspondem às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito e são encontrados no meio ambiente, podendo contaminar água, solo e alimentos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os oocistos, dentre os três estágios infecciosos de *T. gondii*, é o mais virulento (DUBLEY, BEATTIE, 1988).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxeno por apresentar hospedeiros definitivos e intermediários. O ciclo sexuada do parasito se completa apenas pelos hospedeiros definitivos, constituídos pelos membros da Família Felidae; no entanto, o ciclo assexuada ocorre na maioria dos vertebrados endotérmicos, como aves, mamíferos (inclusive seres humanos), além do próprio hospedeiro definitivo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; KAWAZOE, 2005; DA SILVA; LANGONI, 2009). O hospedeiro definitivo (os felídeos) podem se contaminar ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas (DABRITZ; CONRAD, 2010; ELMORE et al., 2010; SCHLUTER et al., 2014). Os parasitos iniciam um rápido processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia formando os merozoítas no epitélio intestinal do hospedeiro, invadem novas células originando os gametas masculinos e femininos e quando fecundados formam oocistos altamente resistentes (NEVES, 2003; DUBEY, 2004). Os felídeos podem eliminar no meio ambiente cerca de 20 milhões de oocistos

contendo esporozoítos infectantes (DUBEY, 2001). Já o homem pode adquirir a toxoplasmose por meio da ingestão de carnes cruas ou mal cozidas de animais contendo cistos, oocistos presentes em água ou alimentos contaminados, taquizoítas presentes em líquidos orgânicos ou mesmo por transfusão sanguínea e a transmissão transplacentária (DA SILVA; LANGONI, 2009), em que os taquizoítas são capazes de atravessar a barreira placentária e infectar os tecidos embrionários ou fetais (CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014).

1.5 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma protozoonose causada por *T. gondii*, apresentando uma elevada soroprevalência na população humana, e muitos estudos relatam que aproximadamente 30% a 60% da população mundial estão infectada por esse parasito (SOMMERVILLE et al., 2013; FOROUTAN-RAD et al., 2016). Entretanto, a prevalência varia muito entre diferentes países e regiões (PAPPAS et al., 2009). Souza e colaboradores (2011) relataram que no Brasil existe uma prevalência de até 60% de brasileiros com toxoplasmose, dependendo da região. Esse dado indica que o Brasil é um dos países com a maior taxa de soroprevalência para toxoplasmose (DUBEY et al., 2012).

A toxoplasmose pode ser um grande problema de saúde pública e econômico (SOMMERVILLE et al., 2013). A infecção nos humanos normalmente cursa de forma assintomática, mas em pacientes imunocomprometidos e em casos de infecção congênita, pode desenvolver um quadro preocupante (WANG et al., 2013; SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014). Pacientes imunocomprometidos, como aqueles HIV positivos e que passam por tratamento quimioterápico, manifestam a doença, na maioria das vezes, pela reativação de cistos pré-existentes. Sendo assim, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, provocando resposta inflamatória grave (ROBERT-GANFNEUX; DARDÉ, 2012; KASPER, BUZONI-GATEL, 1998; MILLER et al., 2009).

A prevenção da toxoplasmose é baseada em programas de educação e saúde pública. Recomenda-se que gestantes evitem contato com materiais que possam estar contaminados, como carnes cruas, frutas e verduras, realizando uma higienização eficiente e tomando cuidado com caixas de areia com dejetos de

gatos (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; OPSTEEGH et al., 2014; SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014).

1.6 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita se estabelece, geralmente, quando a mulher adquire a infecção durante a gestação (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; CHAUDHRY et al., 2014), em razão da passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito, atingindo a circulação e os tecidos fetais (KODJIKIAN, 2010; CARLIER et al., 2012). Entretanto, a infecção materna pode ocorrer também no período pré-concepção e, ainda assim, ocorrer a passagem transplacentária (KODJIKIAN, 2010).

A prevalência mundial de infecção em gestante é bem variável, entre 1% e 92% (PAPPAS et al., 2009; VAZ et al., 2010; LOPES et al., 2012). O período gestacional em que ocorre a infecção materna é fundamental. A transmissão é mais frequente se a infecção materna for adquirida durante o terceiro trimestre de gestação, e é menor quando a infecção materna ocorre durante o primeiro trimestre, sendo sua gravidade inversamente proporcional (ZEMENE et al., 2012). Nos primeiros meses de vida, o recém-nascido pode não apresentar sintomas da toxoplasmose, no entanto, em alguns anos podem aparecer sequelas como, coriorretinite, hidrocefalia, calcificação cerebral (MONTROYA LIENSENFELD, 2004; WEISS. DUBEY, 2009; VILLE. LERUEZ-VILLE, 2014).

Para o sucesso gestacional é necessário que ocorram alterações imunológica, hormonais e fisiológicas, as quais são fundamentais na implantação embrionária e a manutenção do embrião. A principal mudança é caracterizada pelo 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). Entretanto, apesar de ser, geralmente, definida como uma condição predominantemente anti-inflamatória, estudos indicam que a gestação é caracterizada por basicamente três etapas imunológicas (KOGA; ALDO; MOR, 2009). No primeiro período de gestação, há um perfil imune pró-inflamatório com elevada produção de citocinas pelas células T helper do tipo 1 (Th1), de suma importância no processo de implantação do embrião no

endométrio uterino e invasão do trofoblasto (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). No segundo trimestre gestacional, tem-se a fase conhecida como tolerância fetal, caracterizada pela predominância de perfil imune do tipo Th2 e de células T reguladoras (RANGO, 2008; REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012). Por fim, no terceiro trimestre gestacional, ocorre infiltração de células imunológicas para a interface materno-fetal, designando um microambiente inflamatório necessário para o parto (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

A tolerância imunológica durante a gestação é complexa, no sentido em que o organismo materno deve manter um perfil anti-inflamatório para o sucesso gestacional (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). Dessa forma, quando a gestação se dá concomitante à infecção por *T. gondii*, pode estabelecer um desequilíbrio imunológico capaz de resultar em problemas na gestação ou até mesmo aborto (LUPPI, 2003). Isso sucede ao organismo materno a fim de controlar a infecção induzindo uma resposta pró-inflamatória, e acaba desfavorecendo o desenvolvimento fetal (SYKES et al., 2012).

Vários estudos do nosso grupo demonstraram a presença de citocinas relacionadas no controle da infecção por *T. gondii* por células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma humano (BeWo) (BARBOSA et al., 2008). Estas células mostraram-se ser susceptíveis à infecção por *T. gondii* na presença de interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento beta (TGF- β 1) (BARBOSA et al., 2008). Por outro lado, quando as células BeWo estavam na presença da citocina pró-inflamatória IFN- γ , a qual deveria controlar a infecção parasitária, esta não foi capaz de controlar a invasão e replicação de *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008). Castro e colaboradores (2013) evidenciaram que as 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 também que a infecção por *T. gondii* em células BeWo foi controlada apenas quando doses altas de MIF foram adicionadas nestas células, demonstrando que MIF controla a infecção por *T. gondii* no trofoblasto humano de modo dose-dependente (BARBOSA et al., 2014). Também, Guirelli e colaboradores (2015) observaram

que, em células trofoblásticas extravilosas da linhagem celular HTR8/SVneo, a apoptose foi modulada por *T. gondii*, uma estratégia usada pelo parasito para se estabelecer no hospedeiro. Finalmente, ainda não existem estudos que demonstrem a interação de *T. gondii* no trofoblasto extraviloso humano com a participação da citocina MIF, portanto estudos que visem demonstrar esta interação são de grande valia para melhor entender o papel desta citocina na interface materno-fetal invadida por este parasito.

1.7 MIF e Toxoplasmose

MIF desempenha um papel importante na patogênese de bactérias (CALANDRA; ROGER, 2003) infecções causadas por protozoários, tais como, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii* (REYES et al., 2006; JUTTNER et al., 1998; FLORES et al., 2008).

MIF é de fundamental importância contra a infecção por *T. gondii* (FLORES et al., 2008). Camundongos MIF nocaute (ko) são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*, sendo esta susceptibilidade associada com a indução fraca de IL-12, TNF- α e IL-1 β , apresentando um aumento da carga parasitária nos órgãos destes animais (FLORES et al., 2008). Este estudo demonstrou que MIF tem participação na resposta contra infecção por *T. gondii*, uma vez que é capaz de mediar resistência contra este parasito. Outro estudo utilizando camundongos C57BL/6 demonstrou que MIF participa na patogênese por *T. gondii*, promovendo uma ileíte intensa e uma resposta inflamatória sistêmica robusta, resultando em um desenlace desfavorável na fase aguda e também demonstrando um papel patogênico de MIF na infecção natural por *T. gondii* em hospedeiros suscetíveis a IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-23 (CAVALCANTI et al., 2011).

MIF juntamente com a produção de IL-12 conseguem mediar a resistência à infecção por *T. gondii* uma vez que, camundongos selvagens (WT) desenvolveram uma forte resposta pró-inflamatória (IL-12) devido à maturação da população de linfonodo mesentérico (MLNDC) e tornaram-se mais resistentes quando infectados com 40 ou 100 cistos (cepa ME49). Em contraste, camundongos MIF nocaute (ko) infectados com as mesmas quantidades, apresentaram uma resposta fraca de IL-12 e MLNDC imaturos. Com isso, Terraza e colaboradores (2010) demonstraram que a maturação de MLNDC é

induzida por MIF juntamente com produção de IL-12, os quais medeiam infecção por *T. gondii*.

Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que explantes placentários humanos regulam positivamente a produção de MIF em resposta à estimulação com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), indicando uma potencial atividade de MIF na resposta imunológica ao parasito (FERRO et al., 2008). Outro estudo prévio de nosso grupo demonstrou que, a secreção de MIF é regulada positivamente em explantes de primeiro trimestre infectados por *T. gondii* quando comparados com explantes controle (GOMES et al., 2011). No mesmo estudo demonstraram que IFN- γ foi uma citocina importante para a secreção de MIF quando os explantes estavam infectados ou não por *T. gondii* e que a produção de MIF foi estimulada em explantes infectados e tratados com citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras (TGF- β 1, IL-10). Franco e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento com azitromicina foi capaz de aumentar a produção de MIF em células BeWo, sendo esta relacionada na resposta imune durante a gestação e que pode estar envolvida na resistência das células à infecção por *T. gondii*.

Na tentativa de entender os mecanismos de ação de MIF com a intenção de controlar a infecção por *T. gondii* em explantes placentários Gomes e colaboradores (2013) investigaram a via de sinalização intracelular das MAPk em explantes de primeiro e terceiro trimestre de gestação, já que estudos sugerem que as atividades mediadas por MIF podem estar associadas a vias complexas de transdução de sinal gerando ativação de ERK1/2 mediada por receptor de membrana CD74 (KYRIAKIS, 2009; MITCHELL et al., 1999; XU et al., 2013). No estudo, mostraram que a ativação das MAPk não foram importantes em mediar o controle do parasitismo em explantes de primeiro trimestre, sendo que a inibição das vias inibiu a proliferação de *T. gondii* mas, em explantes de terceiro trimestre a inibição das MAPk, principalmente a inibição da ERK1/2 ocasionou aumento do parasitismo, demonstrando que em tecidos de terceiro trimestre a fosforilação de MAPk está relacionada no controle do parasitismo (GOMES et al., 2013).

Por outro lado, Barbosa e colaboradores (2014) verificaram a via de sinalização intracelular (ERK1/2) desencadeadas por MIF em células BeWo, no intuito de analisar se a produção de PGE2 nestas células é dependente de MIF e ERK1/2

na susceptibilidade à infecção por *T. gondii*. O estudo demonstrou que, a ativação da via de sinalização intracelular ERK1/2 e a produção de PGE2 em células BeWo são dependentes da concentração de MIF, isto é, baixas concentrações de MIF desencadeiam fosforilação de ERK1/2 e liberação de PGE2, promovendo maior susceptibilidade à infecção por *T. gondii* e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, concentrações elevadas de MIF não desencadeiam a fosforilação ERK1/2 ou a liberação de PGE2, o que provoca um controle da carga parasitária, demonstrando a importância desses mediadores no modelo de trofoblasto humano. Assim, muitos estudos buscam avaliar a resposta imunológica de células trofoblásticas humanas frente à infecção por *T. gondii*, porém não há dados na literatura científica, até o momento, que demonstre a ação intracelular de MIF em células trofoblásticas extravilosas infectadas por *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA

A ação migratória e invasiva das células trofoblásticas extravilosas desempenham papel fundamental para uma gestação de sucesso. É importante que ocorra esse processo migratório para a decídua; no entanto este processo de migração e invasão deve ser espacial e temporalmente controlado, prevenindo complicações gestacionais. As células trofoblásticas secretam várias citocinas que influenciam a migração e invasão celular durante o estabelecimento da gestação e no equilíbrio materno-fetal. Entre essas citocinas se encontra fator de inibição de migração de macrófagos (MIF). MIF desempenha inúmeras funções imunológicas e fisiológicas durante a gestação. Além disso, esta citocina é capaz de controlar infecções por protozoários como *Toxoplasma gondii*. Entretanto, existem poucos estudos sobre o papel funcional de MIF, e trofoblasto extraviloso no curso de infecção por *T. gondii*. Assim, o presente estudo visa adicionar dados para uma melhor compreensão das funções intracelulares de MIF nas células trofoblásticas extravilosas infectadas por *T. gondii*. Para este propósito, utilizamos células HTR-8/SVneo como modelo experimental de trofoblasto extraviloso humano infectado experimentalmente por *T. gondii* (GUIRELLI et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a participação funcional de MIF na fosforilação de ERK 1/2, infecção por *T. gondii*, expressão de CD44 e migração celular em células HTR8/SVneo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o parasitismo em células HTR8/SVneo infectadas com *T. gondii* e tratadas com MIF recombinante (rhMIF);
- Avaliar o parasitismo em células HTR8/SVneo infectadas com *T. gondii* e tratadas com ISO-1;
- Avaliar a secreção extracelular de MIF nas células HTR8/SVneo infectadas ou não com *T. gondii* e tratadas com MIF recombinante (rhMIF) ou ISO-1;
- Avaliar a expressão do co-receptor de MIF (CD44) nas células HTR8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com MIF recombinante (rhMIF) ou ISO-1;
- Avaliar a expressão da fosforilação da ERK1/2 nas células HTR8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com MIF recombinante (rhMIF) ou ISO-1;
- Avaliar a migração de células HTR8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com MIF recombinante (rhMIF) ou ISO-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células HTR8/SVneo e BeWo

Células trofoblásticas extravilosas humanas (linhagem celular HTR8/SVneo), foram cedidas pela Profa. Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, e mantidas no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. As células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo)

foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Ambas as células foram mantidas em cultura ou armazenadas adequadamente em nitrogênio líquido.

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

O repique das células foi realizado a cada três dias. As células foram lavadas com meio de cultura novo e em seguida adicionou-se 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 RPM completo (suplementado com 10% de SFB, 25 mM de HEPES, 3 mM de bicarbonato de sódio e antibióticos) e as células foram removidas e transferidas para tubos de 15 mL, as quais, foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura com soro e distribuídas em novos frascos de cultura com 15 mL de meio RPMI completo e novamente incubadas a 37 °C e 5% de CO₂.

4.2 Manutenção do clone 2F1 de *T. gondii* em cultura

Os taquizoítas do clone 2F1 de *T. gondii*, expressando a enzima β- galactosidase foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos em células BeWo cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de SFB à 37 °C e 5% de CO₂. À medida que a grande maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelo parasito, os taquizoítas livres foram centrifugados (400 x g, 5 minutos) e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

4.3 Ensaio de MTT

A viabilidade das células HTR8/SVneo tratadas ou não com rhMIF ou ISO-1 e/ou infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* do clone 2F1 foi avaliada utilizando-se o ensaio calorimétrico de MTT, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983). Células HTR8/SVneo, coletadas a partir dos frascos de cultura, foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI completo. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e aquelas inviáveis foram excluídas do processo de quantificação pela coloração com o corante azul de tripan 0,4% (Sigma Chemical Co., Brasil). Em seguida, as células HTR8/SVneo (1×10^4 células/200µL/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂.

Após 24 horas, as células foram tratadas com rhMIF (200 ng/mL) ou ISO-1 (200 µg/mL) e, juntamente com o tratamento, as células foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* do clone 2F1 (3 parasitos:1 célula) por mais 24 horas. Células não tratadas serviram como controles do experimento. Em vista de verificar a toxicidade do DMSO em células HTR8/SVneo, as células foram tratadas com 2% DMSO, desde que o ISO-1 foi diluído em DMSO. Após o tratamento e a infecção, as placas de cultura foram centrifugadas (720 x g por 10 minutos), os sobrenadantes foram removidos e 100 µL/poço de tetrazólio de metiltiazol foram adicionados (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As placas foram incubadas em condições de cultura e, após 3 horas, os poços contendo as células foram novamente centrifugados. Após centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e as partículas insolúveis de coloração roxa, (cristais de formazan) produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT, foram então solubilizadas pela adição de 100 µL/poço de 10% duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica (DO) foi determinada a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Quatro experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição

4.4 Proliferação intracelular de *T. gondii* nas células HTR8/SVneo sob influência de rhMIF ou ISO.

O ensaio de proliferação de *T. gondii* (2F1) foi realizado de acordo com Castro e colaboradores (2013). Células HTR8/SVneo (1×10^4 células/200 µL/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C a 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, estas células foram tratadas ou não com diferentes concentrações de rhMIF (2,5; 5; 15; 50; 100 e 200 ng/mL) ou ISO-1 (200 µg/mL) e, juntamente com o tratamento, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* da cepa 2F1 (3 parasitos : 1 célula). Após 24 horas, as placas foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, e os sobrenadantes foram removidos. Em seguida, foram adicionadas às células 100 µL de tampão de RIPA (100 mM HEPES, pH 8,0, 1 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 5 mM ditiotretitol), 160 µL de tampão de ensaio (100 mM tampão fosfato, pH 7,3, 102 mM β-mercaptoetanol, 9 mM MgCl₂) e 40 µL do substrato CPRG (clorofenol red-β-D-galactopiranosídeo; Roche) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após este período, a atividade enzimática da β-galactosidade foi mensurada a 570 nm usando leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA).

Paralelamente, foi construída uma curva padrão por meio de diluição seriadas, em duplicata de taquizoítas de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a 1×10^6 /poço/100 µL. À curva padrão também foram adicionadas as soluções tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato CPRG e a DO foi mensurada como descrito. Cinco experimentos independentes foram realizados em sextuplicata para cada condição.

4.5 Dosagem extracelular de MIF pelas células HTR8/SVneo.

As células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^5 /1000 µL/poço) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, estas células foram tratadas ou não com diferentes concentrações de rhMIF (2,5; 5; 15; 50; 100 e 200 ng/mL) ou ISO-1 (200 µg/mL) e, juntamente com o tratamento, as células foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* do clone 2F1 (3 parasitos :

1 célula). Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

A dosagem extracelular de MIF no sobrenadante das células HTR8/SVneo foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Brevemente, placas para ELISA com 96 poços de alta afinidade foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-MIF humano (R&D Systems, Abingdon, UK), *overnight* em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBS Tween 20 e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (Soro Albumina Bovina – BSA 1% e PBS) e incubados a temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem das placas, 50 µL das amostras foram adicionadas em triplicata e incubadas a temperatura ambiente por 2 horas. Após lavagem das placas, 50 µL das amostras foram adicionadas em triplicata e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente.

Paralelamente, curvas padrões de MIF foram realizadas em diluições duplas seriadas. As placas foram então lavadas e incubadas com anticorpo de cabra anti-MIF humano biotilado (R&D Systems). Após novas lavagens, as placas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (Zymed, San Francisco, CA) por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A seguir adicionou-se 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (Zymed).

A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de sensibilidade foi 125 pg/mL.

4.6 Expressão de CD44 e fosforilação da ERK 1/2 em células HTR8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas ou não com rhMIF ou ISO.

As células HTR8/SVneo (5×10^5 células/1000µL/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (Kasvi, Curitiba, Brasil). Posteriormente, as células foram tratadas com rhMIF e/ou ISO-1 e juntamente foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* do clone 2F1 (3 parasitos : 1 célula). Após 24 horas, os sobrenadantes livres de células foram recolhidos para medição posterior de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as células foram

utilizadas para analisar a expressão de CD44 e ERK1/2 fosforilada. As células foram homogeneizadas e lisadas em gelo em tampão RIPA (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%), desoxicolato de sódio a 1% (p/v) e dodecilsulfato de sódio a 0,1% (p / v) SDS), suplementado com inibidor de protease (Complete®, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha), ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) e fluoreto de sódio (NaF) (ambos da Sigma) e submetidos a três ciclos de congelamento-descongelamento (GOMES et al., 2011). Após centrifugação a 101 g durante 15 minutos a 4° C recolheu-se o sobrenadante e mensurou-se a concentração de proteína total por ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976).

A concentração total de proteínas (µg/mL) foi utilizada para padronizar a carga proteica para as reações de *Western Blotting*. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (10%) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) com as amostras dos lisados celulares, para avaliação da expressão do co-receptor CD44 e da fosforilação da ERK1/2. Em seguida, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (Imobilon-FL®, Merck S/A) e incubadas com tampão de *blotting* (25 mM Tris, 0,15 NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,4) contendo 4% de leite desnatado desidratado (Molico, Nestlé®) por 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas, primeiramente, com anticorpo primário monoclonal de anti-coelho ERK1/2 fosforilada (0,1 mg/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anticorpo primário monoclonal de anti-coelho CD44 (0,1 mg/mL, Abcam's, RabMab®, San Francisco, U.S) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-β-actina humana (Santa Cruz Biotechnology) durante 12 horas em 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 em temperatura ambiente. Após novas lavagens com tampão de *blotting*, as membranas foram 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 (150 µg) por poço do gel de eletroforese foram confirmadas pela coloração de *Ponceau* 1%. A densitometria foi realizada usando o *software* ChemiDoc. Os valores foram mostrados pela densidade relativa da razão das bandas específicas de cada proteína e β-actina, para análise

da ERK1/2 fosforilada e do co-receptor CD44. Cinco experimentos independentes foram realizados.

4.7 Migração celular

Para a porcentagem de ocupação das células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF (200 ng/mL) ou ISO-1 (200 µg/mL) e infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* da cepa 2F1 (3 parasitos : 1 célula) realizou-se o ensaio de *scratch*. Este ensaio é baseado na interrupção da monocamada celular acompanhada nos tempos 0 horas e 24 horas de acordo com Liang e colaboradores (2007).

Para a análise da porcentagem de ocupação, as células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^5 /1000 µL/poço) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, após confirmação da monocamada aderida na placa, foi realizado o ensaio de *scratch* através de uma interrupção da monocamada. Em linha reta e com a utilização da ponteira p200 foi realizado um traço, na posição vertical, em cada poço, e em seguida foi capturada a primeira imagem (0 horas). A região capturada foi obtida do traçado realizado e pela criação de um ponto de referência na parte externa da placa.

Posteriormente, as células HTR8/SVneo foram tratadas com rhMIF (200 ng/mL) ou ISO-1 (200 µg/mL) e, juntamente com o tratamento, foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* da cepa 2F1 (3 parasitos : 1 célula). Depois, as placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. No dia seguinte, após 24 horas, a placa foi levada ao microscópio e a segunda imagem foi capturada (24 horas), utilizando novamente o ponto de referência correto para obter as mesmas imagens na região fotografada no tempo 0 horas. Todas as imagens foram capturadas utilizando o microscópio Evos (Mill Creek, WA, USA). Após a obtenção das imagens, as análises foram realizadas através do software Image J (National Institutes of Health, EUA), e foi determinada a porcentagem de ocupação das células em cada condição e tempo experimental. Nove experimentos independentes foram realizados em duplicata para cada condição.

4.8 Normas de biossegurança

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

4.9 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (SEM). A comparação dos dados entre os grupos foram analisados pelo teste *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis e como pós-teste pelo Bonferroni e Dunn's, respectivamente. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 A viabilidade das células HTR8/SVneo não foi alterada após o tratamento e infecção

O número de células HTR8/SVneo viáveis após o tratamento com rhMIF ou ISO-1 e/ou infectadas com *T. gondii* foi avaliado por meio da análise colorimétrica do MTT (Figura 1). Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular quando as células foram tratadas com DMSO (DMSO 2%) ou ISO-1 diluído em DMSO (DMSO+ISO) comparadas com as células do grupo controle (células não tratadas e não infectadas). Também, não houve diferença significativa quando as células infectadas foram tratadas com rhMIF(Tg+MIF) ou ISO-1(Tg+ISO) comparadas com as células do grupo controle (Controle) ou com as células apenas infectadas (Tg) (Figura 1).

5.2 Proliferação intracelular de *T.gondii* foi maior nas células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF

Os índices de replicação intracelular do parasito em células HTR8/SVneo foram determinados após tratamento celular com rhMIF ou ISO-1 (Figura 2). Após o tratamento com concentrações crescentes de rhMIF 2,5; 5; 15; 50; 100 e 200 ng/mL observamos o parasitismo intracelular total da infecção quando comparado com as células apenas infectadas (Tg) (Figura 2). Quando tratamos com ISO-1 (Tg+ISO), as células mostraram diminuição significativa parasitismo intracelular total da infecção quando comparado com as células tratadas com rhMIF (Tg+MIF). Também, observamos diferença significativa na replicação intracelular do parasito entre células infectadas (Tg) e células infectadas e tratadas com ISO-1 (Tg+ISO) (Figura 2). O tratamento das células HTR8/SVneo com concentrações crescente de rhMIF, apresentaram o mesmo fenômeno em todos os experimentos. Com isso os experimentos seguintes foram realizados com a concentração de 200 ng/mL

5.3 ISO-1 diminuiu a produção de rhMIF, em células infectadas por *T. gondii*.

A produção de MIF extracelular foi avaliada em sobrenadantes de cultura de células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF ou ISO-1 infectadas ou não com *T. gondii* por ELISA. As células não infectadas e não tratadas (Controle) não apresentaram diferença significativa na produção de MIF extracelular quando comparadas com células tratadas com rhMIF (MIF) ou ISO-1 (ISO) (Figura 3). Quando os dois tratamentos foram comparados, observamos diferença significativa entre rhMIF (MIF) e ISO-1 (ISO), mostrando menor produção de MIF extracelular quando as células foram tratadas com ISO-1 (Figura 3).

Após a infecção, as células HTR8/SVneo infectadas (Tg) apresentaram aumento na produção de MIF extracelular quando comparadas com as células não tratadas e não infectadas (Controle) (Figura 3). Além disso, a infecção com *T. gondii* e o tratamento com ISO-1 (Tg+ISO) diminuíram a produção de MIF extracelular quando comparada com as células infectadas (Tg) ou infectadas e tratadas com rhMIF (Tg+MIF). Não foi observada diferença significativa na

produção de MIF extracelular pelas células HTR8/SVneo infectadas e tratadas com rhMIF (Tg+MIF) comparadas com as células infectadas (Tg) (Figura 3).

5.4 Células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF expressaram mais fosforilação da ERK1/2

Para a detecção do co-receptor CD44 e da ERK1/2 fosforilada foi realizado *imunoblotting* em células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF ou ISO-1 e infectadas com *T. gondii*. Foi observado que as células expressaram o co-receptor CD44 e ERK1/2 fosforilada (Figura 4). Para o co-receptor CD44, as células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF (MIF) ou células infectadas tratadas com rhMIF (Tg+MIF), independentemente da infecção não mudaram a expressão do co-receptor (Figura 4 A, B). Para ERK1/2 foi observado um aumento na expressão da ERK1/2 pelas células não infectadas e tratadas com rhMIF (MIF) comparadas com as células não tratadas e não infectadas (Controle) (Figura 4 C, D). Não foi observada diferença significativa na expressão da ERK1/2 fosforilada pelas células não tratadas e não infectadas (Controle) quando comparadas com as células tratadas com ISO-1 (ISO) (Figura 4 D). Após a infecção, a expressão da ERK1/2 fosforilada aumentou significativamente em células tratadas com rhMIF (Tg+MIF) comparadas com as células apenas infectadas (Tg) (Figura 4D).

5.5 A migração celular é diminuída após o tratamento com ISO-1

A porcentagem de ocupação das células HTR8/SVneo infectadas e tratadas com rhMIF ou ISO-1 foi analisada através do ensaio de *scratch*. Foi observada diminuição significativa na migração das células não infectadas e tratadas com ISO-1 (ISO) comparadas com as células não infectadas e tratadas com rhMIF (MIF) (Figura 5). Também foi observada diminuição significativa na migração das células não infectadas e não tratadas (Controle) comparadas com as células não infectadas e tratadas com ISO-1 (ISO). A migração celular das células HTR8/SVneo não infectadas e não tratadas (Controle) não apresentaram diferença significativas comparadas com as células infectadas e não tratadas (Tg).

Após a infecção, as células tratadas com rhMIF (Tg+MIF) ou com ISO-1 (Tg+ISO) apresentaram uma diminuição na migração celular quando comparadas com as células não infectadas e não tratadas (Controle) (Figura 5 A). Não foi observada diferença significativa na migração celular quando células infectadas (Tg) foram comparadas com as células infectadas e tratadas com rhMIF (Tg+MIF) ou comparadas com células infectadas e tratadas com ISO-1 (Tg+ISO). Também não foi observada diferença significativa na migração celular quando células infectadas e tratadas com rhMIF (Tg+MIF) foram comparadas com células infectadas e tratadas com ISO-1 (Tg+ISO) (Figura 5A). As imagens representativas da migração (Figura 5 B-N).

6. DISCUSSÃO

A gravidez consiste de um processo fisiológico natural compreendido pela sequência de adaptações ocorridas no corpo da mulher a partir da fertilização. A implantação do embrião, a decidualização e a placentação são processos fundamentais para o sucesso gestacional (GELLERSEN et al, 2007; MA et al., 2015). Durante o primeiro trimestre de gestação ocorrem mudanças na decídua, como a invasão e migração das células trofoblásticas extravilosas, responsáveis pelo remodelamento das arteríolas espiraladas (BUCKLEU et al., 2016). Durante esse processo, existe a participação funcional de várias moléculas como (MATSUMOTO et al., 2016) fatores de crescimento (APLIN, 1991; LALA et al., 2003), proteinase (BISCHOF et al., 1995; POLLHEIMER et al., 2014), moléculas de adesão (DAMSKY et al., 1994), e proteínas do sistema imune através da secreção de citocinas e quimiocinas (DU et al., 2014; XIE et al., 2016).

A citocina MIF, desde sua descoberta em 1966 (BLOOM; DAVID), provou ser uma molécula de estudo intrigante para muitos cientistas. Devido ao seu envolvimento em uma série de condições patológicas tais como infecções (DAS et al., 2013) e câncer (DU et al., 2013), a utilização de ISO-1, é uma das abordagens terapêuticas destinadas a inibir a atividade enzimática de MIF (KRIVOKÚKA et al., 2014). Vários estudos relatam a secreção desta citocina por diferentes órgãos e células como, leucócitos (BUCALA et al., 2007) e células trofoblásticas extravilosas (CARDAROPOLI et al., 2012). Além disso,

MIF pode desempenhar um papel importante em macrófagos ativados para eliminar parasitas intracelulares, como *T. gondii* (JÜTTNER et al., 1998).

Em um estudo anterior, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se que a secreção de MIF foi regulada positivamente em explantes de primeiro trimestre infectados por *T. gondii* quando comparados com explantes que não foram infectados, desempenhando um papel essencial na infecção placentária (GOMES et al., 2011). Além disso, outro estudo mostrou alta secreção de MIF por células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii*, demonstrando uma estratégia usada pelo parasito para reduzir a morte celular (GUIRELLI et al., 2015). No entanto, não existem estudos que elucidem a participação de MIF e os mecanismos intracelulares ativados para esta citocina em células trofoblásticas extravilosas humanas infectadas por *T. gondii*, para isso, usamos como modelo experimental células HTR8/SVneo (GUIRELLI et al., 2015).

No presente estudo, primeiramente, verificamos a citotoxicidade de rhMIF e ISO-1 nas células HTR8/SVneo. A escolha das dosagens para o ensaio de citotoxicidade para este estudo foi realizada com base em estudos anteriores utilizando diferentes concentrações de rhMIF (10-200 ng/mL) e ISO-1 (1-200 µg/mL) em células HTR8/SVneo, em que tais concentrações não foram tóxicas (KRIVOKÚKA et al., 2014). Desta forma, as concentrações experimentais para o ensaio de citotoxicidade neste estudo foram 200 ng/mL para rhMIF e 200 µg/mL para ISO-1. Como esperado, o tratamento com rhMIF ou ISO-1 não foram citotóxicos para as células HTR8/SVneo.

Uma vez estabelecidas as concentrações, investigamos a infecção por *T. gondii* em células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF ou ISO-1. Nossos resultados demonstraram que em células tratadas com rhMIF houve aumento na replicação parasitária. Além disso, observamos diminuição da replicação do parasito quando as células foram tratadas com ISO-1. Vários estudos relatam os efeitos protetores do MIF em algumas infecções, como *T. gondii*, na interface materna fetal. Um estudo realizado em explantes de vilos coriônicos sugere que MIF pode desempenhar um papel importante no controle da infecção por *T. gondii* no microambiente placentário (FERRO et al., 2008; GOMES et al., 2011). Outro estudo realizado com camundongos MIF^{-/-} demonstrou que esses animais são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, mostrando que essa citocina

desempenha um papel crítico no controle da infecção por *T. gondii* (FLORES et al., 2008). Em contraste, no presente estudo, as células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF apresentaram uma elevada replicação parasitária. Para verificar se a quantidade de citocina recombinante influenciaria no parasitismo, testamos várias concentrações de rhMIF (2,5; 5; 15; 50; 100 e 200 ng/mL). Observamos que, independentemente das concentrações de rhMIF utilizada, a replicação parasitária não diminui. Desta forma, o tratamento com rhMIF aumenta a replicação de *T. gondii* em células HTR8/SVneo. Por outro lado, quando as células HTR8/SVneo foram tratadas com ISO-1 observamos diminuição na proliferação do parasita. Assim, MIF participa de mecanismos envolvidos na proliferação de *T. gondii* em células HTR8/SVneo, aumentando a susceptibilidade deste tipo de celular.

Uma vez que os tratamentos tiveram efeitos na proliferação parasitária, avaliamos a ação de rhMIF e ISO-1 na secreção extracelular de MIF por células HTR8/SVneo infectadas. Foi observado que células infectadas secretaram mais MIF comparadas com células não infectadas. Isso demonstra que a infecção é um fator que estimula a produção desta citocina. Quando as células foram tratadas com 200µg/mL ISO-1, a concentração de MIF extracelular diminuiu independentemente da infecção por *T. gondii*. Como esperado, estes resultados demonstram a capacidade ISO-1 de inibir a concentração de MIF extracelular pelas células HTR8/SVneo. Além disso, as células infectadas e as células infectadas e tratadas com rhMIF produziram maior quantidade de MIF extracelular. Estes resultados indicam que mesmo o rhMIF sendo detectado pelo ensaio ELISA, o parasita tem a capacidade de induzir a secreção de MIF. Assim, esses dados sugerem que o aumento da produção de MIF pelas células infectadas e tratadas com rhMIF pode ser um mecanismo de defesa de *T. gondii*, que proporciona sua maior sobrevivência nesta população celular. Alguns estudos demonstram as estratégias adquiridas por *T. gondii* para disseminação e sobrevivência no hospedeiro (QUAN et al., 2015). Mammari e colaboradores (2015) demonstraram que, *T. gondii* modula a secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento como, IL-6, MIF, fator 3 estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) e factor estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) em células endoteliais, escapando da resposta imune e promovendo sua persistência. Em outro estudo realizado por

Rico-Torres e colaboradores (2016) descreve-se que, *T. gondii* modula algumas moléculas como, IFN- γ , MIF ou ICAM-1, podendo ajudar o parasita a atravessar o sincitiotrofoblasto, e assim, chegar ao embrião durante os estágios iniciais da gestação. Outro estudo realizado por nosso grupo demonstrou que a infecção por *T. gondii* aumentaram citocinas como IL-6, TGF- β 1 e MIF em células HTR8/SVneo como estratégia utilizada pelo parasito para reduzir a morte celular (GUIRELLI et al 2015).

Avaliando os resultados da secreção de MIF, nós demonstramos que o aumento desta citocina ocorreu principalmente na presença do parasita. Especulamos que MIF foi produzido em resposta ao parasito e, consequentemente, associou-se ao seu receptor, desencadeando uma cascata de sinalização em resposta à infecção. Assim, verificamos a presença do co-receptor MIF (CD44) em células HTR8/SVneo. Nossos dados demonstraram que o tratamento com rhMIF, independentemente da infecção, não demonstrou a expressão de CD44. Esses achados estão de acordo com um estudo prévio que mostrou expressão de CD44 em células da placenta como, células decíduais (BEVILACQUA et al., 2014) e células trofoblásticas (KRIVOKÚCA et al., 2014; PRZYBYL et al., 2016). CD44 participa em muitos processos celulares, como crescimento, sobrevivência, diferenciação e proliferação (SEIPEL et al., 2010). Na interface materno-fetal tem um importante papel na função celular e na manutenção do endométrio (BEVILACQUA et al., 2014).

Não existem muitos estudos relacionando *T. gondii* à capacidade de modular a expressão do co-receptor CD44. Seipel e colaboradores (2010) demonstraram que *T. gondii* regula a expressão de fatores relacionados à migração como, MMP9, $\alpha\beta$ 3, MT1-MMP e a expressão de co-receptores como CD44 utilizando-os como “acesso” à algumas células permitindo que este parasito atravessasse barreiras biológicas, como, por exemplo, a placenta. Além disso, MIF medeia atividades biológicas através da forte ligação ao receptor CD74, levando a fosforilação de CD44 e ativando vias de sinalização (BEVILACQUA et al., 2013). Przybye e colaboradores (2016) demonstraram que o receptor CD74 pertence ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II, sendo essencial para biogêneses de várias células e é expresso por trofoblasto. Alguns estudos ressaltam a importância da expressão do CD74 na superfície celular e sua capacidade de se ligar ao MIF estimulando várias vias de

sinalização. Werzker e colaboradores (2003) demonstraram que a ativação de CD74 por MIF está envolvido no processo de apoptose celular, devido a fosforilação da via de sinalização PI3K. Outro estudo demonstrou que MIF promove proliferação celular por ativar membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPk) gerando ativação de ERK1/2 por meio de transdução de sinal mediada por receptor de membrana CD74 (KYRIAKIS, 2009; MITCHELL et al., 1999).

Devido ao conhecimento de que a ligação forte entre o MIF e seu receptor/co-receptor (CD74/CD44) desencadeiam via de sinalização intracelular, quisemos demonstrar a presença de fosforilação ERK1/2 nas células HTR8/SVneo e a relação com o aumento da proliferação parasitária. A ativação de ERK 1/2 é induzida pela proteína quinase A dependente e associada com a atividade da enzima citoplasmática fosfolipase A2 (PLA2). PLA2 é uma importante proteína intracelular, porque pode ativar a cascata pró-inflamatória, resultando na produção de ácido araquidônico e, em seguida, de prostaglandinas E2 (PGE2) e leucotrienos (CALANDARA et al., 2000; BORGES et al., 2016). As prostaglandinas (PGs) representam uma família de mediadores lipídicos e a produção de prostaglandina E2 (PGE2) ocorre através das ciclooxigenases (COX), especialmente a COX-2 (CHEN et al., 2014; WANG et al., 2005). Nos seres humanos, as PGs estão envolvidas em funções reprodutivas como ovulação, menstruação, implantação (POYSER et al., 1995) e decidualização (CHALLIS et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que a PGE2 está implicada em ações pró-inflamatórias, incluindo fortes efeitos imunossupressores (XIONG et al., 2014; CAGLIARDI et al., 2010). Assim, a indução de produção de PGE2 tem sido um mecanismo de escape de alguns patógenos, incluindo *T. gondii* (VALDEZ et al., 2012). No presente estudo, os dados demonstraram que o tratamento com rhMIF, independentemente da infecção, aumentou a fosforilação de ERK1/2 concordando com vários estudos na literatura. Wang e colaboradores (2011) demonstraram que MIF induz alta regulação da expressão de COX-2 e da secreção de PGE em culturas primárias de células, através da sua interação com o receptor CD74, devida fosforilação da via de sinalização ERK1/2. Outro estudo relacionou a ativação da fosforilação ERK1/2 por meio da citocina MIF em que, estimulava a síntese de PGE2 desencadeando a ativação de múltiplas enzimas e induzindo um fenótipo

inflamatório por células endometriais (CARLI et al., 2009). E um estudo realizado por nosso grupo, demonstrou-se que MIF participa da resposta imune contra *T. gondii*, desencadeia fosforilação da ERK1/2 e produção de prostaglandina E2 (PGE2) em células BeWo (BARBOSA et al., 2014). Portanto, sugerimos que a fosforilação ERK1/2 induza a produção de COX-2 e, consequentemente, a produção de PGE2, levando a uma maior proliferação parasitária.

A migração de células trofoblásticas extravilosas aos tecidos maternos é pré-requisito para uma implantação embrionária normal e este processo é influenciado pela secreção de MIF (KRIVOKÚCA et al., 2014). Na ausência de MIF, a migração das células diminui e pode resultar em complicações como pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal (KRIVOKÚCA et al., 2014). Uma vez estabelecida a capacidade de *T. gondii* em modular MIF a seu favor, investigamos a migração de células HTR8/SVneo não infectadas ou infectadas e tratadas com rhMIF ou ISO-1 (DENKERS et al., 1998). Nossos resultados mostraram que MIF foi necessário para migração das células HTR8/SVneo não infectadas, mas em células infectadas a sua ação não foi significativa. Em um estudo foi demonstrado que MIF estimulou a migração de células HTR8/SVneo, enquanto ISO-1 diminuiu sua capacidade migratória, devido à sua capacidade de inibir a citocina (KRIVOKÚCA et al., 2014). Em outro estudo, também foi demonstrado que células neurais progenitoras (NCPCs) tratadas com MIF aumentaram a migração em comparação com as células não tratadas. Quando o receptor MIF (CD74) foi neutralizado, as células diminuíram a migração (OHTA et al., 2012). Deste modo, podemos considerar que MIF é importante para a migração das células HTR8/SVneo, mas *T. gondii* é capaz de modular a migração e as vias de sinalização.

Sabe-se que, patógenos bem-sucedidos, como *T. gondii* desenvolveram estratégias para “driblar” células imunes. A infecção por *T. gondii* induz muitas alterações na transcrição de genes das células hospedeiras, incluindo aqueles envolvidos no metabolismo energético, respostas imunes e sinalização intracelular (HUNTER; SIBLEY, 2012). Um estudo mostrou que *T. gondii* pode produzir um homólogo de MIF (TgMIF) apresentando a capacidade de modular as respostas imunológicas do hospedeiro, garantindo sua permanência e sobrevivência. Além disso, TgMIF é capaz de se ligar com o receptor CD74 e

desencadear diversas vias de sinalização, como ERK1/2 favorecendo a invasão do parasita (SOMMERVILLE et al., 2013). Esse homólogo de MIF aparece envolvido em respostas imunes inatas e adaptativas e afetam a migração celular, secreção de citocinas pró-inflamatórias e diferenciação celular ou morfogênese (SOMMERVILLE et al., 2013). Em conjunto, nossos dados sugerem que, quando as células trofoblásticas extravilosas HTR8/SVneo são infectadas, *T. gondii* é capaz de modular a produção de MIF extracelular, e consequentemente a fosforilação da ERK1/2, levando ao aumento da proliferação parasitária. Além disso, MIF é importante para a migração celular, em que o parasita é capaz de modular as vias de sinalização para garantir o sucesso da infecção. Novas investigações são necessárias para entender melhor a ação intracelular de MIF em células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii*, principalmente a investigação do receptor CD74 e as proteínas envolvidas na cascata de sinalização da ERK1/2, como COX e PLA2.

7. CONCLUSÕES

A análise dos nossos dados nos permite concluir que:

- rhMIF aumentou a proliferação intracelular *T. gondii* em células HTR8/SVneo;
- ISO-1 diminuiu a proliferação intracelular *T. gondii* em células HTR8/SVneo;
- Células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com rhMIF aumenta a secreção de MIF extracelular;
- Células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii* e tratadas com rhMIF aumenta a fosforilação da ERK1/2 em células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF;
- *T. gondii* modula a migração celular em células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF.

8. FIGURAS

Figuras

Figura 1

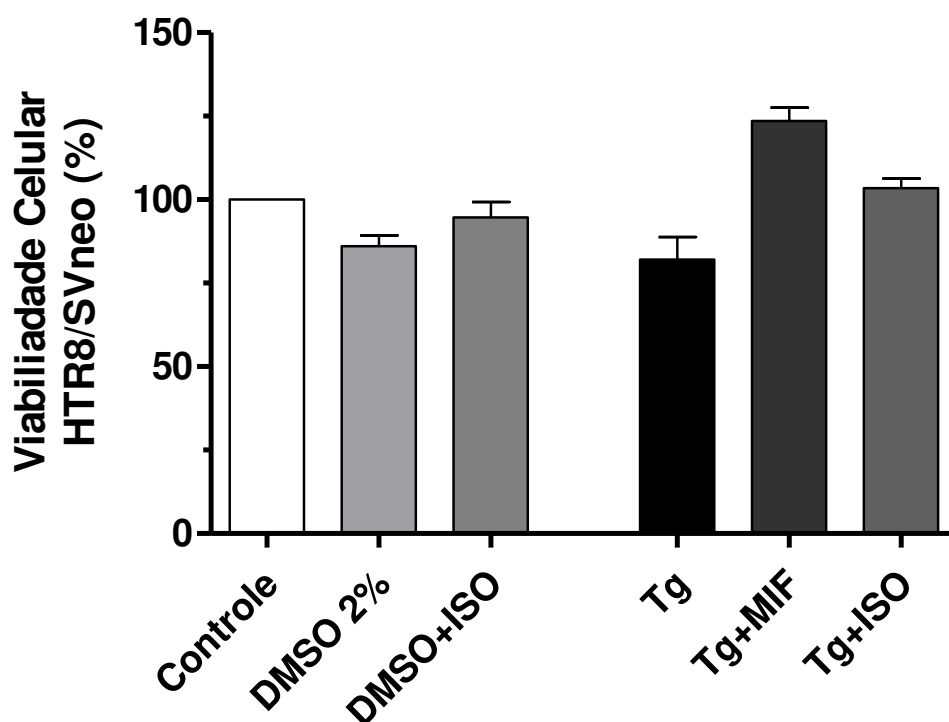


Figure 1. Viabilidade das células HTR8/SVneo após infecção e tratamento com rhMIF (Tg+MIF) ou ISO-1 (Tg+ISO). Como controle, as células foram tratadas ou não com DMSO (Controle e DMSO 2%, respectivamente) ou com ISO-1 diluído em DMSO (DMSO+ISO). Células foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 /200 μ L/poço) à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* (3parasito: 1célula) e tratadas com 200 ng/mL ou rhMIF ou 200 μ g/mL de ISO-1. O número de células viáveis foi analisado utilizando o ensaio de MTT. Os dados foram expressos na porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (média \pm DP) e são representativos de quatro experimentos independentes em triplicata (Teste One-way ANOVA e post-teste Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 2

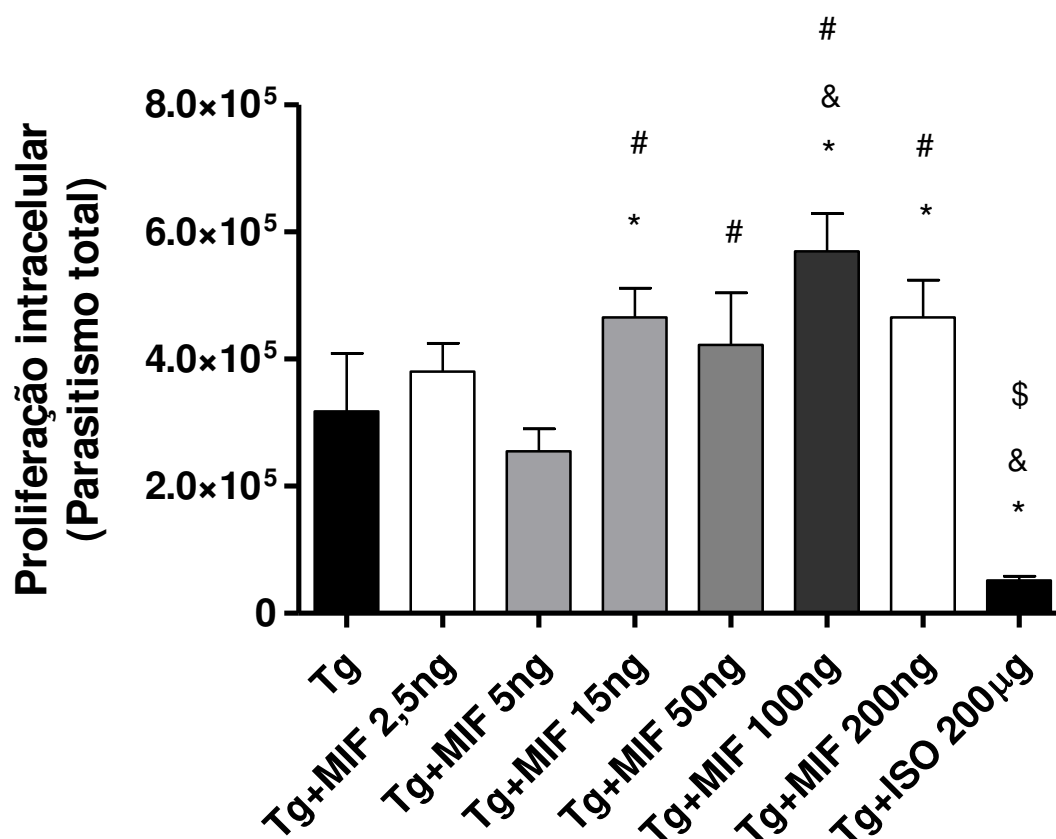


Figure 2. Replicação intracelular de *T.gondii* nas células HTR8/SVneo tratadas com rhMIF (Tg+MIF) ou ISO-1 (Tg+ISO). Células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10⁴/200µL/poço) à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com *T. gondii* (3 parasitos: 1 célula) e tratadas com concentrações crescentes de rhMIF 2,5; 5; 15; 50; 100 e 200 ng/mL de rhMIF ou 200 µg/mL de ISO-1. Como controle, as células foram infectadas e não tratadas (Tg). As células foram analisadas pelo ensaio de β-galactosidase. Os dados foram expressos em média ± DP e são representativos de cinco experimentos independentes em triplicata. * Comparação entre Tg e diferentes concentrações de rhMIF e ISO. & Comparação entre Tg+MIF (2,5 ng) e Tg+MIF (100 ng). & Comparação entre Tg+MIF (2,5 ng) e Tg+ISO. # Comparação entre Tg+MIF (5 ng) e diferentes concentrações de rhMIF. \$ Comparação entre Tg+MIF (200ng) e Tg+ ISO (Teste One-way e post-teste Bonferroni, $p < 0, 05$).

Figura 3

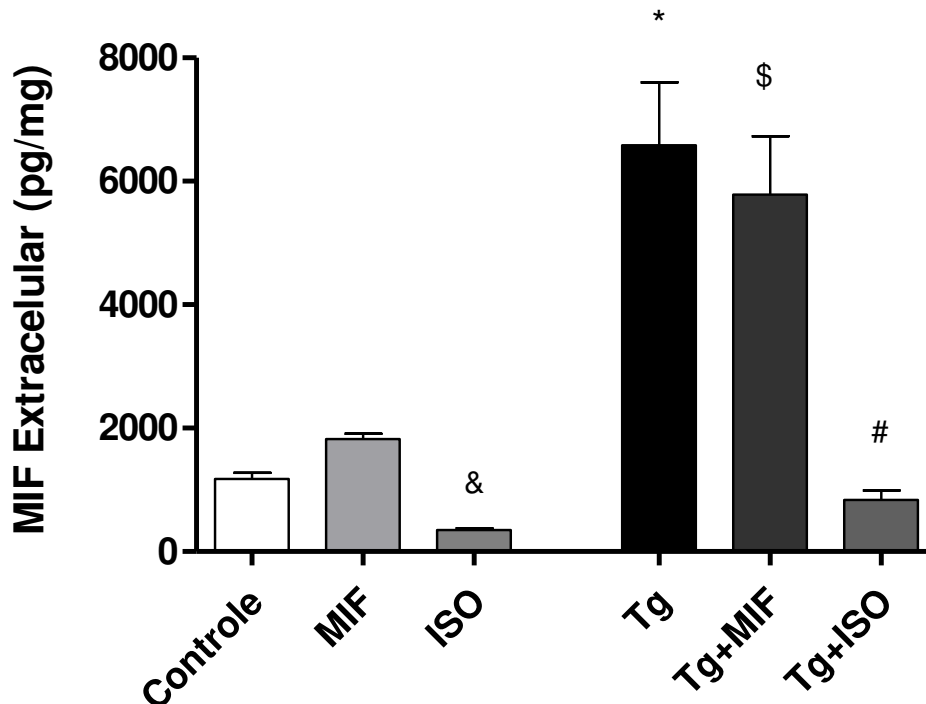
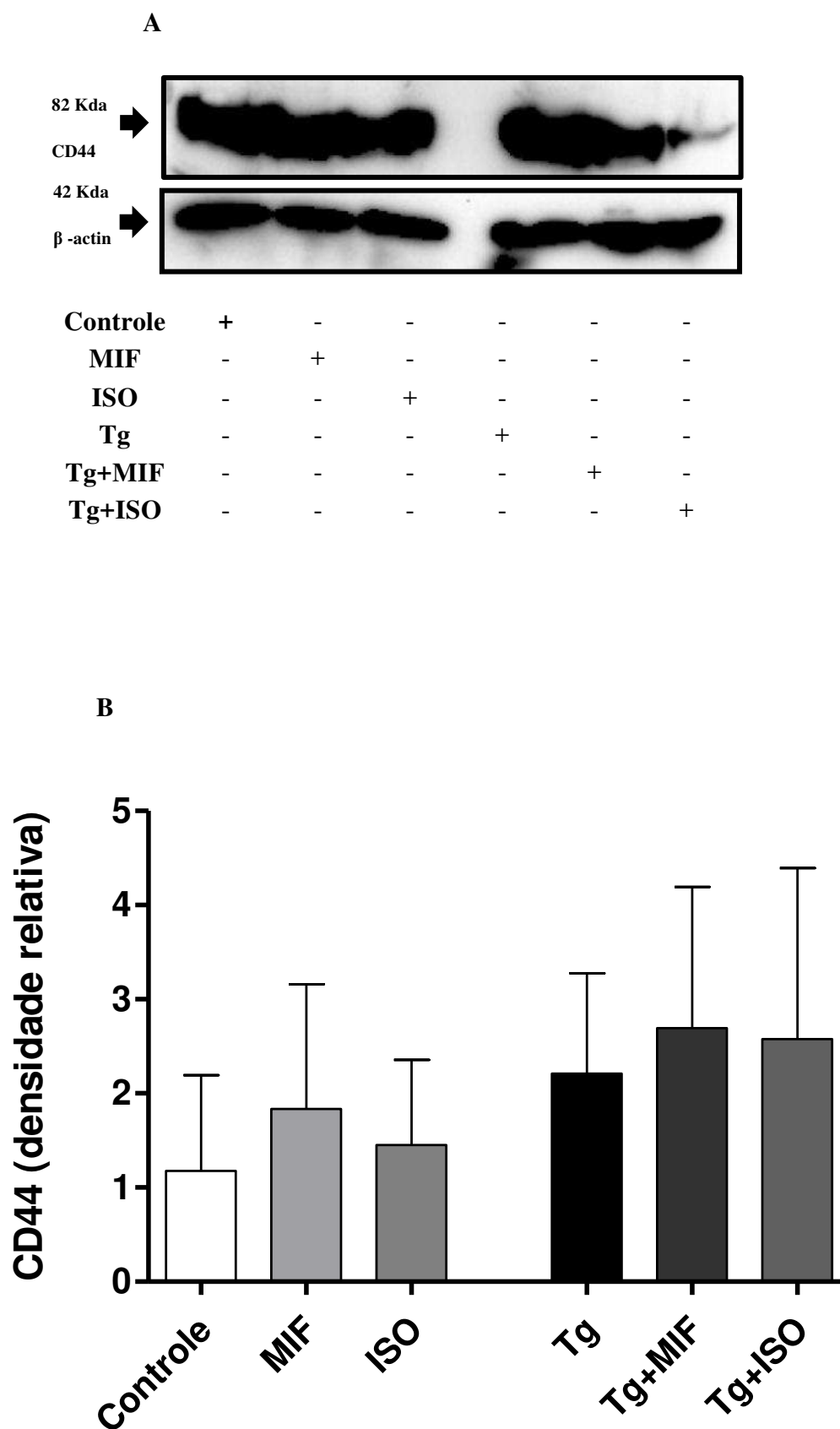


Figura 3. Produção de MIF extracelular em células HTR8/SVneo infectadas por *T.gondii* (Tg) e/ou tratadas com rhMIF (Tg+MIF) ou ISO-1 (Tg+ISO). Como controle, as células HTR8/SVneo não foram tratadas ou foram tratadas com rhMIF ou ISO-1 (Controle, MIF, e ISO, respectivamente). As células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 24 poços (3×10^5 células/300µL/poços) à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* (3parasito: 1célula) e tratadas com 200 ng/mL ou rhMIF ou 200 µg/mL de ISO-1. Os dados foram expressos como média \pm SEM e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. * Comparação entre Controle e Tg. & Comparação entre MIF e ISO-1. # Comparação entre Tg e Tg+ISO. \$ Comparação entre Tg+MIF e Tg+ISO (Teste Kruskal-Wallis, post-teste Dunn's, $p < 0,05$).

Figura 4



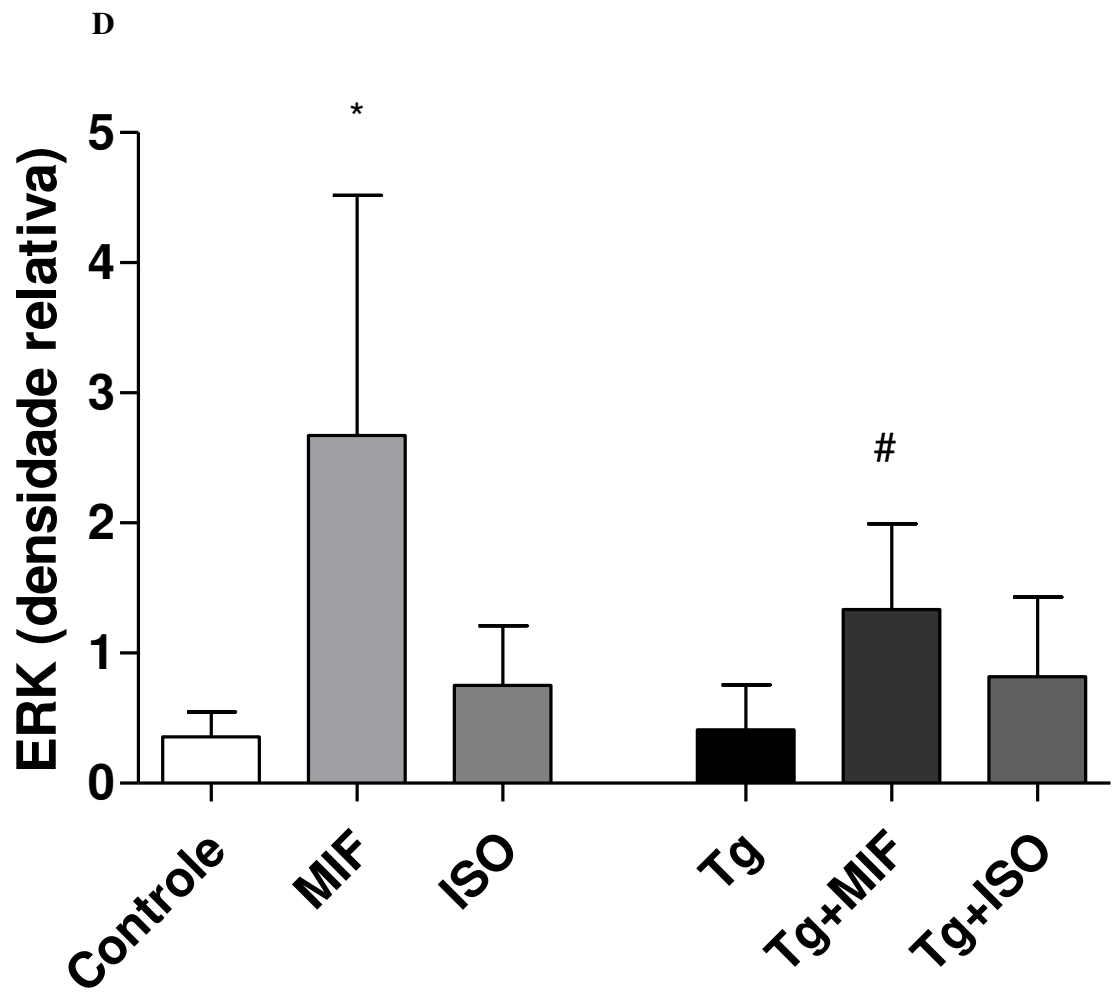
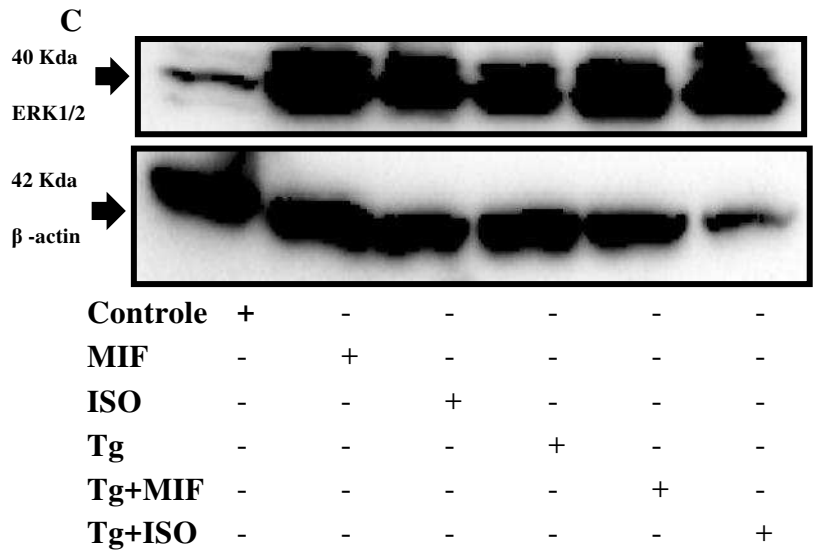
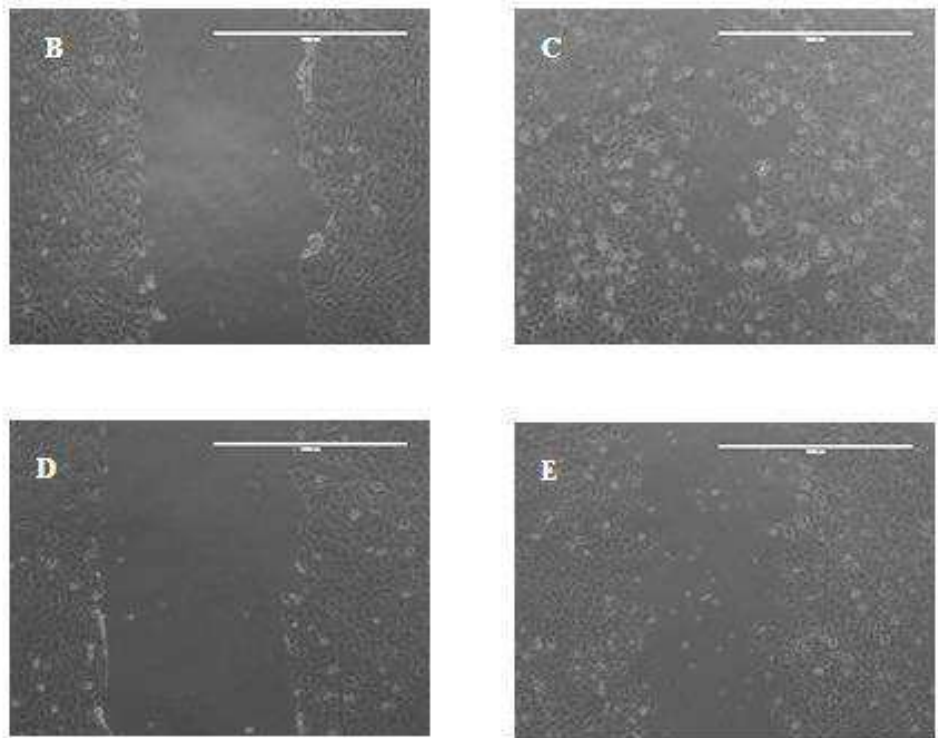
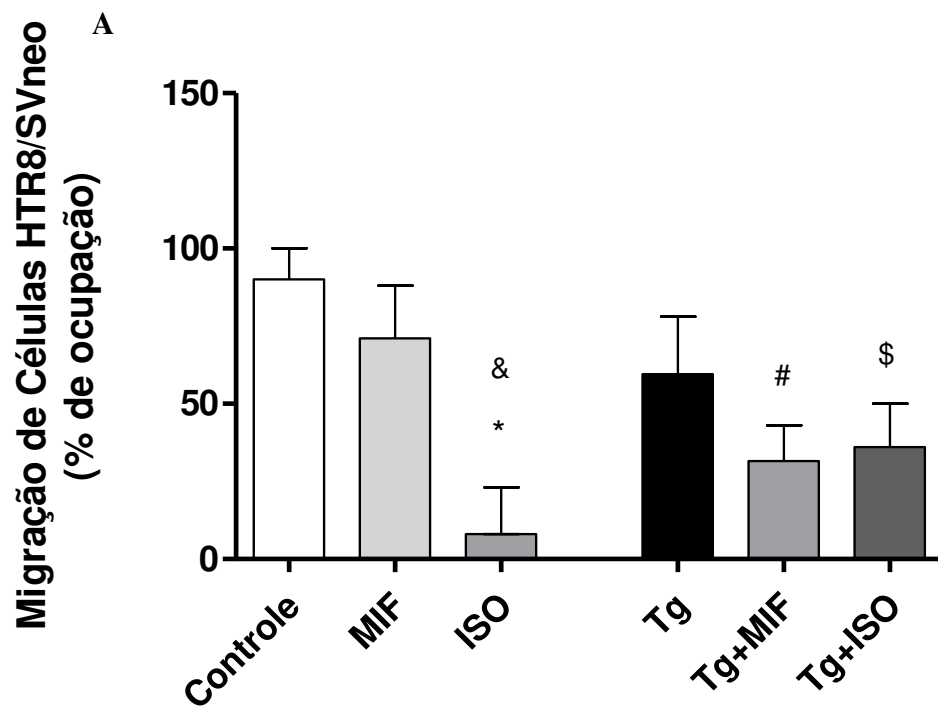


Figure 4: (A) *Immunoblotting* para detecção do co-receptor CD44 (C) *Immunoblotting* para detecção da ERK1/2 fosforilada em células HTR8/SVneo infectadas por *T.gondii* (Tg) e/ou tratadas com rhMIF (Tg+MIF) ou ISO-1 (Tg+ISO). Como controle, as células HTR8/SVneo não foram tratadas ou foram tratadas com rhMIF ou ISO-1 (Controle, MIF, e ISO, respectivamente). As células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^5 células/1000 μ L/poços) à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* (3parasito: 1célula) e tratadas com 200 ng/mL ou rhMIF ou 200 μ g/mL de ISO-1. (B, D) Dados quantitativos obtidos da densitometria das bandas detectadas na reação de *Western blott* expressos como média \pm SEM e são representativos de nove experimentos independentes em duplicata. * Comparação entre Controle e MIF. # Comparação entre Tg e Tg + MIF (Teste Kruskal-Wallis e pos-teste Dunn, $p < 0,05$).

Figura 5



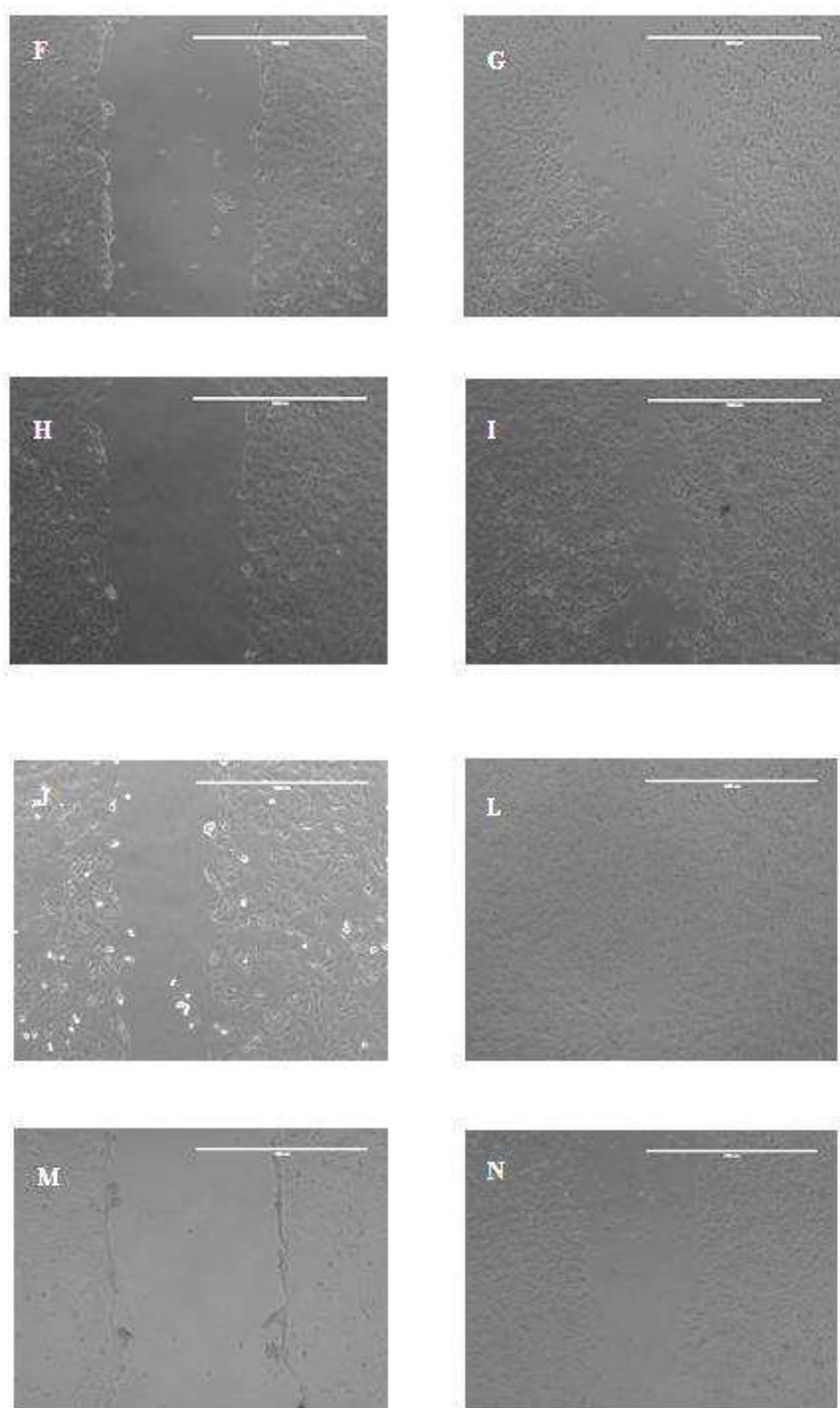


Figura 5: (A) Porcentagem ocupacional das células HTR8/SVneo pelo ensaio de *scratch*. Células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii* (Tg) e/ou tratadas com rhMIF

(Tg+MIF) ou ISO-1 (Tg+ISO). Como controle, as células HTR8/SVneo não foram tratadas ou foram tratadas com rhMIF ou ISO-1 (Controle, MIF, e ISO, respectivamente). Células foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^5 células/1000 μ L/poço) à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* (3parasito: 1célula) e tratadas com 200 ng/mL ou rhMIF ou 200 μ g/mL de ISO-1. Os dados estão expressos como média \pm SEM e são representativos de nove experimentos em duplicata. & Comparação entre MIF e ISO. * Comparação entre Controle e ISO. # Comparação entre Controle e Tg+MIF. \$ Comparação entre Controle e Tg+ISO (Teste Kruskal-Wallis, post-teste Dunn, $p < 0,05$). Fotomicrografia representativa de células não tratadas e não infectadas (**B**) no tempo de 0 horas e (**C**) no tempo de 24 horas. Fotomicrografia representativa de células tratadas com rhMIF (MIF) (**D**) no tempo de 0 horas e (**E**) no tempo de 24 horas. Fotomicrografia representativa de células tratadas com ISO-1 (ISO) (**F**) no tempo de 0 horas e (**G**) no tempo de 24 horas. Fotomicrografia representativa de células infectadas por *T. gondii* (Tg) (**H**) no tempo de 0 horas e (**I**) no tempo de 24 horas. Fotomicrografia representativa de células infectadas e tratadas com rhMIF (Tg+MIF) (**J**) no tempo de 0 horas e (**L**) no tempo de 24 horas. Fotomicrografia representativa de células infectadas e tratadas com ISO-1 (Tg+ISO) (**M**) no tempo de 0 horas e (**N**) no tempo de 24 horas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUMAREE. M. H., CHAMLEY. L. W., BADRI. M., EL-MUZAINI. M. F. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? **J Reprod Immunol**, v. 2, n. 94, p. 131-41, 2012.

AL-ABED.Y., DABIDEEN. D., ALJABARI. B., VALSTER. A., MESSMER. D., OCHANI. M. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsi. **J Biol Chem**, v. 280, p. 36541-4, 2005.

AL-ABED.Y., VANPATTEN. S. MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic. **Future MedChem**, v. 3, p. 45–63, 2011.

APLIN. D. J. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence *in vivo* and *in vitro*. **J Cell Sci**, v. 99, p. 681–692, 1991.

ARCURI.F., CINTORINO.M., VATTI. R., CARDUCCI. A., LIBERATORI. S., PAULESU. L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. **Biol Reprod**, United States, v. 60, n. 6, p. 1299-1303, Jun, 1999.

ARCURI.F., RICCI.C., IETTA. F., CINTORINO. M., TRIPODI. S. A., CENTIN. I., GARZIA. E., SCHATZ. F., KLEMI. P., SANTOPIETRO. R., PAULESU. L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, United States, v. 64, n. 4, p. 1200-1205, Apr, 2001.

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. 45-536, 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.

BARRAGAN. F., IRWIN. J. C., BALAYAN. S., ERIKSON. D. W., CHEN. J. C., HOUSHDARAN. S., PILTONEN. T. T., SPITZER. T. L., GEORGE. A., RABBAN. J. T., NEZHAT. C., GIUDICE. L. C. Human Endometrial Fibroblasts Derived from Mesenchymal Progenitors Inherit Progesterone Resistance and Acquire an Inflammatory Phenotype in the Endometrial Niche in Endometriosis. **Biol Reprod**, v. 5, n. 94, p. 118, 2016.

BENIRSCHKE.K.; KAUFMANN. P., BAERGEN. R. N. Pathology of the Human Placenta. **NewYork: Springer**, 2000.

BENIRSCHEKE. K., SATO. Y. Increased prevalence of fetal thrombi in monochorionic-twin placentas. **Pediatrics**, v. 1, n. 117, p. 7–113, 2006.

BERNHAGEN. J., CALANDRA. T., MITCHELL. R. A., MARTIN. S. B., TRACEY. K. J., VOELTER. W., MANOGUE. K. R., CERAMI. A., BUCALA. R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, United States, v. 365, n. 6448, p. 9-756, Oct, 1993.

BERNHAGEN. J., KROHN. R., LUE. H., GREGORY. J. L., ZERNECKE. A., KOENEN. R. R. DEWOR. M., GEORGIEV. I., SCHOBER. A., LENG. L., KOOISTRA. T., FINGERLE-ROWSON. G., GHEZZI. P., KLEEMANN. R., MCCOLL. S. R., BUCALA. R., HICKEY. M. J., WEBER. C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. **Nat Med**, v. 13, p. 587-596, 2007.

BEVILACQUA. E., PAULESU. L., FERRO. V. A. E., IETTA. F., FARIA. R. M., LORENZON. R. A., COSTA. F. A., MARTUCCI. M. Putative roles for the macrophage migration inhibitory factor at the maternal fetal interface. **Placenta**, v. 28, p. 551-856, 2014.

BISCHOF. P., MEISSER. A., CAMPANA. A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion: a review. **Placenta**, v. 21 Suppl A, p. 55-60, 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**, v. 117, n. 5-6, 2009.

BLOOM. B. R., BENNETT. B. Mechanism of a reaction in vitro associates with delayed-type hypersensitivity. **Science**, Unites States, v. 153, n. 731, p. 80-82, Jul, 1966.

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

BORGES. P. I., CASTANHEIRA. E. L., BARBOSA. F. B., SOUZA. N. L. D., SILVA. J. R., MINEO. R. J., TUDINI. Y. A. K., RODRIGUES. S. R., FERRO. V. A. E., RODRIGUES. M. V. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induce by BnSP7 a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, v. 119, p. 81-84, 2016.

BOZZA. M., SATOSKAR. A. R., LIN. G., LU. B., HUMBLE. A. A., GERARD. C., DAVID. J. R. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsi. **J Exp Med**, United States, v. 189, n. 2, p. 6-341, Jan, 1999.

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.

- BUCALA. R. MIF, the most interesting factor. **World Scientific**, v. 332, 2007.
- BUCKLEY. J. R., WHITHEY. S. G., DUMITIU. E. I., CARTWRIGHT. E. J. Macrophage polarization affects their regulation of trophoblast behavior. **Placenta**, v. 74, p. 73–80, 2016.
- BURTON. G. J., JAUNIAUX. E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics e Gynecology**, v. 213, suppl. 4, S6,1, S6-8, Oct., 2015.
- CAGLIARDI. M. C., TELONI. R., MARIOTTI. S., BROMURO. C., CHIANI. P., ROMAGNOLI. G., GIANNONI. F., TOROSANTUCCI. A., NISINI. R. Endogenous PGE2 promotes the induction of human Th17 responses by fungal α -glucan. **J Leukoc Biol**, v. 88, p. 947-954, 2010.
- CALANDRA.T., ECHTENACHER. B., ROY. D. L., PUGIN. J., METZ. C. N., HULNER. L., HEUMANN. D., MANNEL. D., BUCALA. R., GLAUSER. M. P. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. **Nature Med**, v. 6, p. 164-170, 2000.
- CALANDRA. T., ROGER. T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, England, v. 3, n. 10, p. 791-800, Oct, 2003.
- CALANDRA. T., BERNHAGEN. J., METZ. C. N., SPIEGEL. L. A., BACHER. M., DONNELLY. T. CERAMI. A., BUCALA. R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. **Nature**, v. 377, n. 6544, p. 68-77, 1995.
- CARDAROPOLI.S., IETTA.F., ROMAGNOLI. R., ROLFO. A., PAULESU. L., TODROS. T. Lower Macrophage Migration Inhibitory Factor Concentrations in maternal serum before pre-eclampsia onset. **Journal of Interferon e Cytokine Research**, v. 34, p. 537-542, 2014.
- CARDAROPOLI. S., PAULESU. L., ROMAGNOLI. R., IETTA. R., MARZIONI. D., CASTELLUCCI. M., ROLFO. A., VASARIO. E., PICCOLI. E., TODROS. T.

Macrophage migration inhibitory factor in fetoplacental tissues from preeclamptic pregnancies with or without fetal growth restriction. **Clin Dev Immunol**, 2012.

CARLI. C., METZ. N. C., AL-ABED. Y., NACCACHE. H. P., AKOUM. A. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Human Endometriotic Cells by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Involvement of Novel Kinase Signaling Pathways. **Endocrinology**, v. 150, n. 7, p. 3128–3137, July, 2009.

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

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

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.

CAVALCANTI. G. M., MESQUITA. S. J., MADI. K., FEIJO. F. D., MIRANDA. A. I., SOUZA. P. S. H., BOZZA. T. M. MIF Participates in *Toxoplasma gondii* - Induced Pathology Following Oral Infection. **PlosOne**, v. 6, n. 9, p. 25259, 2011.

CHSAVANEEYAKORN.S., MOORE. J. M., OTHORO. C., OTIENO. J., CHAIYAROJ. S. C., SHI. Y. P., NAHLEN. B. L., LAL. A. A., UDHAYA. K. V. Placenta malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **J Infected Dis**, United States, v. 186, n. 9, p. 1371-1375, Nov, 2002.

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.

CHALLIS. J. R. G., SLOBODA. D. M., ALFAIDY. N., LYE. S. J., GIBB. W., PATEL.F. A. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth.**Reproduction**, v. 124, p. 1-17, 2002.

CHAMLEY, L. W., HOLLAND. O. J., CHEN. Q., VIAL. C. A., STONE. P. R., ABUMAREE. M. Review: where is the materno interface? **Placenta**, v. 35, suppl. S75-80, 2014.

CHAOUAT. G., PETITBARAT. M., DUBANCHET. S., RAHMATI.M., LEDÉE. N. Tolerance to the fetal allograft?. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 624–636, 2010.

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

CHEN. X., BO. H., YANPING. C. BAYAN. G., AGHADASI., YUE Z. Migration Inhibitory Factor Enhances Inflammation via CD74 in Cartilage End Plates with Modic Type 1 Changes on MRI. **Clin Orthop Relat Res**, v. 472, p. 1943-1954, 2014.

COCKBURN. K., ROSSANT. J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. **J Clin Invest**, v. 4, n. 120, p. 995–1003, 2010.

COWPER. B., MATTHEWS. S., TOMLEY. F. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 186, p. 1-10, 2012.

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

DABRITZ. H. A., CONRAD. P. A. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 34-52, 2010.

DALY. D. C., MASLAR. I. A., RIDDICK. D. H. Term decidua response to estradiol and progesterone. **AM J Obstet Gynecol**, v. 6, n. 145, p. 83-679, 1983.

DAMSKY. H. C., LIBRACH. C., LIM. H. K. FITZGERALD. L. M., MCMASTER. T. M., JANATPOUR. M., ZHOU. Y., LOGAN. K. S., FISHER. J. S. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. **Development**, v. 120, p. 3657-3666, 1994.

DAS. R., KOO. M. S., KIM. B. H., JACOB. S. T., SUBBIAN. S., YAO. J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 110, p. 2997-3006, 2013.

DAVID. J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **PNAS**, Unites States, v.56, n. 1, p. 72-77, Jul, 1966.

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

DESMONTS. G., NAOT. Y., REMINGTON. J. S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **J Clin Microbiol**, v.14, p. 486–491, 1981.

DU. W., WRIGHT. B. M., LI. X., FINKE. J., RINI. B. L., ZHOU. M. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor promotes an autocrine loop that enhances renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 32, p. 74-1469, 2013.

DU. W., WRIGHT. M. B., LI. X., FINKE. J., RINI. L. B., ZHOU. M. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor promotes an autocrine loop that enhances renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 32, p. 74-1469, 2014.

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. 99-267, Apr, 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. Toxoplasmosis of Animals and Humans.**CRC Press**, 2010.

DUBEY. J. P., HILL. D. E., ROZEBOOMB. D. W., RAJENDRANA. C., CHOUDHARYA. S., FERREIRA. A. 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.

DUBLEY, J. P., BEATTIE. C. P. Toxoplasmosis of animal and man. **Boca Raton**, Florida: CRC Press, 1988.

ELMORE. S. A., JONES. J. L., CONRAD. P. A., PATTON. S., LINDSAY. D. S., DUBEY. J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol**, v. 26, p. 190-196, 2010.

ELSHEIKHA. H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for futher health promotion action. **Public Health**, v. 122, p. 335-353, 2008.

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., 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., MINEO. J. R., IETTA. F., BECHINI., 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. **Am J Pathol**, United States, v. 172, n. 1, p. 50-58, Jan, 2008.

FEST.S., ALDO. P. B., ABRAHAMS. V. M., VISINTIN. I., ALVERO. A., CHEN. R., CHAVEZ. S. L., ROMERO. R., MOR. G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 1, n. 57, p.55-66, 2007.

FLORES. M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J**, United States, v. 22, n. 10, p. 1-11, Oct, 2008.

FOROUTAN-RAD. M., MAJIDIANI. H., DALVAND. S., DARYANI. A., KOOTI. W., SAKI. J., HEDAYATI-RAD. F., AHMADPOUR. E. Toxoplasmosis in blood donors: A systematic review and meta-analysis. **Transfusion Medicine Review**, 2016.

FRANCO. P. S., GOMES. A. O., BARBOSA. B. F., ANGELONI. M. B., SILVA. N. M., TEIXEIRA-CARVALHO. A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, p. 44-838, 2011.

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

GELLERSEN. B., BROSEN. I. A., BROSEN. J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and critical perspectives. **Semin Reprod Med**, v. 25, p. 445-453, 2007.

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. 8-233, Feb, 2002.

GOMES. O. A., SILVA. D. A. O., SILVA. N. M., BARBOSA. F. B., FRANCO. S. P., MANGELONI. B. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol**, v. 178, p. 801-2792, 2011.

GOMES. O. A. A função do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) no controle da infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas é dependente da idade gestacional, Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

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. 14-1106, Oct, 2015.

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. 9-141, Mar, 2015.

HUNTER. C., SIBLEY. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors, v. 10, p. 766-776, 2012.

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

IETTA. F., Y. WU, R. ROMAGNOLI et al., "Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta," **American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 1, p. 272–280, 2007.

IWAHASHI.M., MURAGAKI.Y., OOSHIMA. A., YAMOTO. M., NAKANO. R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. **J Reprod Fertil**, v. 108, p. 147–155, 1996.

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

JUTTNER.S., BERNHAGEN. J., METZ. C. N., ROLLINGHOFF. M., BUCALA. R., GESSNER. A. Macrophage migration inhibitory factor induce killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . **J Immunol**, United States, v. 161, n. 5, p. 90-2383, Sep, 1998.

KAMERKAR. S., DAVIS. P. H. *Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. **J Parasitol Res**, p. 589295, 2012.

KÄMMERER. U. Antigen-presenting cells in the decidua. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 89, p. 96-104, 2005.

KASPER. L. H., BUZONI-GATEL. D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitol Today**, England, v. 14, n. 4, p. 150-156, Apr, 1998.

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. D. P., MELO. A. L., LINARDI. P. M., VITOR. R. W. A. *Toxoplasma gondii*. **Parasitologia Humana**, v. 11, p. 56-147, 2005.

KLEIN. C., TROEDSSON. M. Macrophage Migration Inhibitory Factor is Expressed by Equine Conceptuses and Endometrium. **Reprod Domest Anim**, Germany, v. 48, n. 2, p. 297-304, Apr, 2013.

KLIMAN.H. J. Uteroplacental blood flow.The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion.**Am J Pathol**, v. 157, p. 1759 –1768, 2000.

KODJIKIAN. L. Toxoplasmosis and pregnancy. **J Fr Ophtalmol**, v. 5, n. 33, p. 7–362, 2010.

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.

KRIVOKÚCA. J. M., STEFANOSKA. I., RABI. A. T., AL-ABED. Y., STOSIC-GRUJICIC.S., VICOVAC. L. J. Pharmacological inhibition of MIF interfere with trophoblast cell migration and invasiveness. **Placenta**, v. 36, p. 150-159, 2014.

KYRIAKIS. J. M. Thinking outside the box.**J Biol Chem**. v. 284, n. 17, p. 10993-10994, 2009.

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

LALA. K. P., CHAKRABORTY. C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injuri. **Placenta**, v. 24, p. 575–587, 2003.

LAMBERT. H., HITZIGER. N., DELLACASA. I., SVENSSON. M., BARRAGAN. A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cell Microbiol**, v.8, p. 1611-1623, 2006.

LYALL. F., BULMER. J. N., DUFFIE. E., COUSINS. F., THERIAULT. A., ROBSON. S. C. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. **Am J Pathol**, v. 5, n. 158, p. 21-1713, 2001.

LEECH.M., LACEY. D., XUE. J. R., SANTOS. L., HUTCHINSON. P., WOLVETANG. E., DAVID. J. R., BUCALA. R., MORAND. E. F. Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 48, p. 1881–1889, 2003.

LENG. L., METZ. C. N., FANG. Y., XU. J., DONNELLY. S., BAUGH. J., DELOHERY. T., CHEN. Y., MITCHELL. R. A., BUCALA. R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. **J Exp Med**, v. 197, p. 1467-1476, 2003.

LENG. L., BUCALA. R. Insight into the biology of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. **Cell Research**, v. 16, p. 162-168, 2006.

LI. W., XU. R. J., ZHANG. H. H., JIANG. L. H. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, p. 8-1673, 2006.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.. In vitro scratch assay: a convenient inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, 2007.

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

LOPES. A. P., DUBEY. J. P., MOUTINHO. O., GARGATÉ. M. J., 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.

LUBETSKY. J. B. The tautomerase activity of MIF is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. **J Biol Chem**, v. 277, p. 24976-24982, 2002.

LUE. H. W., YANG. X., WANG. R., QUIAN. W., XU. R. Z., LYLES. R., OSUNKOYA. A. O., ZHOU. B. P., VESSALLA. R. L., ZAYZAFOON. M., LIU. Z. R., ZHAU. H. E., CHUNG. L. W. LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-

mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling. **PlosOne**, v. 11, n. 6, 2011.

LUE. H., KAPURNIOTU. A., FINGERLE-ROWSON. G., ROGER. T., LENG. L., THIELE. M., CALANDRA. T., BUCALA. R., BERNHAGEN. J. Rapid and transient activation of the **ERK** MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. **Cell Signal**, v. 5, n. 18, p. 688-703, 2006.

LUE. H., KLEEMANN. R., CALANDRA. T., ROGER. T., ROGER. T., BERNHAGEN. J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes Infect**, France, v. 4, n. 4, p. 60-449, Apr, 2002.

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

LYALL.F., ROBSON. S. C., BULMER. J. N. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. **Hypertension**, v. 6, n. 62, p. 54-1046, 2013.

LYONS. R. E., MCLEOD. R., ROBERTS. C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v.18, p. 198-201, 2002.

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.

MATSUMOTO. H., KONISHI. I., FUHIWARA. H. CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion. **Placenta**, v. 47, p. 105–112, 2016.

MAMMARI. N., VIGNOLES. P., ADNAN. M., DARDÉ. L. M., COURTIUUX. B. Interferon gamma effect on immune mediator production in human nerve cells infected by two strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasite**, v. 22, p. 39, 2015.

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. 40-229, Apr, 2014.

MILLER. S. B. Prostaglandins in health and disease: an overview. **Semin Arthritis Rheum**, p. 36–3749, 2006.

MILLER. L., HUNT. J. S. Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone. *J Immunol, United States*, v. 160, n.10, p.5098-5104, May, 2009.

MINEO. J. R., SILVA. D. A. O., SOPELETE. M. C., LEAL. G. S., VIDIGAL. L. H., TÁPIA. L. E. R., BACCHIN. M. T. **Pesquisa na área biomedical: do planejamento à publicação**. Edufu. 2005.

MITCHELL. R. A., METZ. C. N., PENG. T., BUCALA. R. Sustained Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmatic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). **J Biol Chem**, United States, v. 274, n. 25, p. 6-18100, 1999.

MIYAZAKI. S., TSUDA.H., SAKAI. M., HORI. S., SASAKI. Y., FUTATANI. T., MIYAWAKI.T., SAITO. S. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, p. 514-522, 2003.

MIZUE.Y., GHANI.S., LENG. L., MCDONAL. C., KONG. P., BAUGH. J., LANE. S. J., CRAFT. J., NISHIHARA. J., DONNELLY. S. C., ZHU. Z., BUCALA. R. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 102, p. 14410–14415, 2005.

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

MOORE. K., SULLIVAN. M. H., ELDER. M. G., MOSCOSO. G., TAYLOR. K. M. Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. **Prox Natl Acad Sci**, v. 2, n. 90, p. 91-687, 1993.

MOSMANN. T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods, Amsterdam*, v. 65, n. 1 - 2, p. 55-63, 1983.

NAGAMATSU. T., SCHUST. D. J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. **Reprod Sci**, v. 3, n. 17, Mar, 2010.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 56-147, 2003.

NGUYEN. M. T., LUE. H., KLEEMANN. R., THIELE. M., TOLLE. G., FINKELMEIER. D., WAGNER. E., BRAUN. A., BERNHAGEN. J. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro- oxidative stress-induced apoptosis. **J Immunol**, v. 170, p. 3337-3347, Mar, 2003.

NICOLETTI. F., CRÉANGE. A., ORLIKOURSKI. D., BOLGERT. F., MANGANO. K., METZ. C., DI MARIO. R., AL-ABED. Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) seems crucially involved in Guillain-Barré syndrome and experimental allergic neuritis. **J Neuro Immunol**, v. 168, p. 168-174, 2005.

OGAWARA.Y., KISHISHITA.S., OBATA.T., ISAZAWA.Y., SUZUKI.T., TANAKA. K. AKT enhances Mdm 2- mediated ubiquitination and degradation of p53. **J Biol Chem**, v. 272, p. 50–21843, 2002.

OHKAWARA.T., TAKEDA. H., MIYASHITA. K., NISHIWAKI. M., NAKAYAMA. T., TANIGUCHI. M., YOSHIKI. T., TANAKA. J., IMAMURA. M., SUGIYAMA. T., ASAKA. M., NISHIHARA. J. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in mouse colon by macrophage migration inhibitory factor. **Histochem Cell Biol**, v. 125, n. 5, p. 82-575, May, 2005.

OHTA.S., MISAWA. A., FUKAYA. R., INOUE. S., KANEMURA.Y., OKANO. H., KAWAKAMI. Y., TODA. M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells. **Journal of cells science**, v. 13, p. 3210-3220, 2012.

ONODERA. S., NISHIHARA. J., KOYAMA. Y., MAJIMA. T., AOKI. Y., ICHIYAMA. H., ISHIBASHI. T., MINAMI. A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 5, p. 47-1437, May, 2004.

OPSTEEGH. M. M., KORTBEEK. T. L., HAVELAAR. A. A., VAN DER GIESSEN. J. J. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clin Infect Dis**, 2014.

PAPPAS. G., ROUSSOS. N., FALAGAS. ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol**, England, v. 39, n. 12, p. 94-1385, oct, 2009.

POLACHEK. H., HOLCBERG. G., POLACHEK. J., RUBIN. M., FEINSHTEIN.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. 8-833, May, 2010.

POYSER. N. L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 53, p. 147–195, 1995.

PRZYBYE. L., HAASE. N., GOLIC. M., RUGOR. J., SOLANO. E. M., ARCK. C. P., GAUSTER. M., HUPPERTZ. B., EMONTZPH. C., STOPPE. C., BERNHAGEN. J., LENG. L., BUCALA. R., SCHULZ. H., HEUSER. A., WEEDON-FEKJAE. S. M., JOHNSEN, M, G., PEETZ. D., LUFT. C. F. STAFF. C. A., MÜLLER. N. D., DECHEND. R., HERSE. F. CD74-Downregulation of Placental Macrophage-Trophoblastic Interactions in Preeclampsia. **Cellular Biology**, p. 55-68, 2016.

POLLHEIMER. J., FOCK. V., KNÖFLER. M. Review: The ADAM metalloproteinases novel regulators of trophoblast invasion? **Placenta**, v. 35, 2014.

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

QUAN. H. J., CHU. Q. J., CHOI. I. W., ISMAIL. H. A., ZHOU. W., CHA. G. H., XHOU. Y., YUK. J. M., JO. E. K., LEE. Y. H. Intracellular Networks of the PI3K/AKT and MAPK Pathways for Regulating *Toxoplasma gondii*-Induced IL-23 and IL-12 Production in Human THP-1 Cells. **PlosOne**, v. 10, p. 11, 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.

RED-HORSE. K., ZHOU. Y., GENBACEV. O., PRAKOPHOL. A., FOULK. R., MCMASTER. M., FISHER.S. J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **J Clin Invest**, v. 6, p. 114, p. 744–754, 2004.

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

REYES. J. L.; TERRAZAS. L. I., ESPINOZA. B., CRUZ-ROBLES. D., SOTO. V., RIVERA-MONTOYA. I., GÓMEZ-GARCÍA. L., SNIDER. H., SATOSKAR. A. R., RODRÍGUEZ-SOSA. M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Ommun**, v. 74, n. 6, p. 79-3170, Jun, 2006.

REZENDE-OLIBEIRA. 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. 9, n. 33, p. 7–682, 2012.

RICO-TORRES. P. C., VARGAS-VILLAVICENCIO. A. J., CORREA. D. *Is Toxoplasma gondii type related to clinical outcome in human congenital infection?* **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2016.

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

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.

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. 606-2598, Set, 2012.

SALKER.M. S., CHRISTIAN. M., STEEL. J. H., NAUTIYAL. J., LAVERY. S., TREW. G., WEBSTER. Z., AL-SABBAGH. M., PUCHCHAKAYALA. G., FÖLLER. M., LANDLES. C., SHARKEY. A. M., QUENBY. S., APLIN. J. D., REGAN. L., LANG. F., BROSENS. J. J. Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. **Nat Med**, v. 11, n. 17, p. 13-1509, 2011.

SCHLUTER. D., DAUBENER. W., SCHARES.G., GROSS. U., PLEYER. U., LUDER. C. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int J Med Microbiol**, 2014.

SEIPEL. D., OLIVEIRA. L. C., RESENDE. L. T., SCHUINDT. S. H. S., PIMENTEL. O. M. P., KANASHIRO. M. M., ARHOLDT. V. C. A. *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 312-319, 2010.

SEPULVEDA-ARIAS. J. C., GOMEZ-MARIN. J. E., BOBIC. B., NARANJO-GALVIS. C. A., DJURKOVIC-DJAKOVIC. O. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Med Infect Dis**, 2014.

SHAH. Y. M., ITO. S., MORIMURA. K., CHEN. C., YIM. S. H., HAASC. V. M., GONZALES. F. J. Hypoxia-inducible factor augments experimental colitis through and MIF-dependent inflammatory signaling cascade. **Gastroenterology**, v. 134, p. 2036-2048, 2008.

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.

SHI.X. LENG. L., WNAG. T., WANG. W., DU. X., LI. J., MCDONALD. C., CHEN. Z., MURPHY. J. W., LOLIS. E., NOBLE. P., KNUDSON. W., BUCALA. R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. **Immunity**, v. 25, p. 595-606, 2006.

SIBLEY. L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Ver**, v. 1, n. 240, p. 72-91, 2011.

SOLDATI. D., MEISSNER. M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, p. 4-32, 2004.

SOMMERVILLE. C. Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **J Biol Chem**, v. 18, p. 12733-12741, 2013.

SOUZA. F., CARDOSO. S. INCIDÊNCIA DE TOXOPLASMOSE NO BRASIL, V.6, N.1, 2011.

SUGUITAN. A. L. J. R., SUGUITAN. A. L. J. R., LEKE. R. G., FOU DA. G., ZHOU. A., THUITA. L., METENOU. S., FOGAKO. J., MEGNEKOU. R., TAYLOR. D. W. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with

Plasmodium falciparum malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, Unites States, v. 88, p. 82-1074, Jul, 2003.

SUZUKI. H., KANAGAWA. H., NISHIHARA. J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos, **Immunology Letters**, Netherlands, v. 51, n. 3, p. 141-147, Jul, 1996.

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*, p. 967629, 2012.

TAKAO.T., ASANOMA. K., KATO. K., FUKUSHIMA. K., TSUNEMATSU. R., HORAKAWA. T., MATSUMURA.S., TAKEDA. S., MAKE. N. Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and HTR8/SVneo cell line. **PlosOne**, v. 6, p. 1-11, 1990.

TARNOWSKI.M., GRYMULA. K., LIU. R., TARNOWSKA. J., DRUKALA. J., RATAJCZAK. J. MITCHELL. R. A., RATAJCZAK. M. Z., KUCIA. M. Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts. **Mol Cancer Res**, v. 8, p. 1328-1343, 2010.

TERRAZA. A. C., IMELDA. J. L. I., TERRAZA. E. A., CALLEJA. R. M. *Toxoplasma gondii*: Impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Experimental Parasitology**, v.126, n. 3, p. 348–358, Nov, 2010.

UNDURTI. D. Critical advances in septicemia and septic shock. **Crit Care**, v. 4, n. 5, p. 6-290, Sep, 2000.

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.

VALDEZ. P. A., VITHAYATHIL. P. J., JANELSINS. B. M., SHAFFER. A. L., WILLIAMSON. P. R., DATTA. S. K. Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 functions and interleukin-17 expression in T cells. **Immunity**, v. 36, p. 79-668, 2012.

VERAX. P. L., MEYER-SIEGLER. K. L. Anatomical location of macrophage migration inhibitory factor in urogenital tissues, peripheral ganglia and lumbosacral spinal cord of the rat. **BMC Neuroscience**, v. 4, p. 17, 2003.

VILLE. Y., LERUEZ-VILLE. M. Managing infections in pregnancy. **Curr Opin Infect Dis**, v. 3, n. 27, p. 7–251, 2014.

WADA. S., FUJIMOTO. S., MIZUE. Y., NISHIHARA. J. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the human ovary: presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. **Biochem Mol Biol Int**, England, v. 41, n. 4, p. 805-814, Apr, 1997.

WANG. H., DEY. S. K. Lipid signaling in embryo implantation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 77, p. 84–102, 2005.

WANG. H. DEY. S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 7, p. 185–199, 2006.

WANG. F., WU. H., XU. S., GUO. X., YANG. J. SHEM. X. Macrophage migration inhibitory factor activates cyclooxygenase 2- prostaglandin E2 in cultured spinal microglia. **Neuroscience Research**, v. 71, p. 210–218, 2011.

WANG. M. F., LU. Y. C., LAI. C. S. Up regulation of Matrix Metalloproteinases -2 and -9 via an ERK1/2/ NF-κB pathway in Murine mast cells infected with *Toxoplasma gondii*. **Infections Disease**, v. 149, p. 146-155, 2013.

WASSARMAN. P. M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. **Cell**, v. 2, n. 96, p. 175–183, 1999.

WEISER.W. Y. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. **PNAD**, United States, v. 86, n. 19, p. 61989-7522, Oct, 1989.

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.

WETZKER. R., BÖHMER. F. D. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 7–651, 2003.

WILSON. J. M., COLETTA. P. L., CUTHBERT. R. J., SCOTT. N., MACLENNAN. K., HAWCROFT. G., LENG. L., LUBETSKY. J. B., JIN. K. K., LOLIS. E., MEDINA. F., BRIEVA. J. A., POULSOM. R., MARKHAM. A. F., BUCALA. R., HULL. M. A. Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. **Gastroenterology**, v. 129, n. 5, p. 503-1485, Nov, 2005.

WINSHIP. A., CUMAN. C., RAINCZUK. K., DIMITRIADIS. E. Fibulin-5 is upregulated in decidualized human endometrial stromal cell and promotes primary human extravillous trophoblast outgrowth. **Placenta**, v. 36, p.1405-1411, 2015.

XIE. L., SADOVSKY. Y. The function of miR-519d in cell migration, invasion, and proliferation suggests a role in early placentation. **Placenta**, v. 48, p. 34–37, 2016.

XIONG. H., ZHANG. X., CHENG. Y. Protective effect of taraxasterol against LPS-induced endotoxic shock by modulating inflammatory responses in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 1, n. 36, p. 6–11, 2014.

XU. L., LI. Y., SUN. H., ZHEN. X., QIAO. C., TIAN. S., HOU. T. Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. **Drug Discov Today**, 2013.

YAMADA. H., KATO. E. H., MORIKAWA. M., SHIMADA.S., SAITO. H., WATARI. M., MINAKAMI. H., NISHIHARA. J. Decreased serum levels of

macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. **Hum Reprod**, v. 18, p. 616–620, 2003.

YU. C. M., LAI. K. W., CHEN. Y. X., HUANG. X. R., LAN. H. Y. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. **J Histochem Cytochem**, v. 51, n. 5, p. 31-625, May, 2003.

ZEMENE. E., YEWHALAW. D., ABERA. S., BELAY. T., SAMUEL. A., ZEYNUDIN. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors among pregnant women in Jimma town, Southwestern Ethiopia. **BMC Infect Dis**, p. 12– 337, 2012.