

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

**Influência de células trofoblásticas BeWo e infecção por *Toxoplasma gondii* na modulação dos mecanismos de morte celular em células THP-1**

**Andressa da Silva Castro**

**Uberlândia**  
**Abril – 2017**

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

**Influência de células trofoblásticas BeWo e infecção por *Toxoplasma gondii* na modulação dos mecanismos de morte celular em células THP-1**

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

**Aluna: Andressa da Silva Castro**  
**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloisa Amália Vieira Ferro**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celene Maria de Oliveira Simões Alves**

**Uberlândia**  
**Abril – 2017**

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

---

C355f  
2017

Castro, Andressa da Silva, 1987  
Influência de células trofoblásticas BeWo e infecção por  
*Toxoplasma gondii* na modulação dos mecanismos de morte celular em  
células THP-1 / Andressa da Silva Castro. - 2017.  
104 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Coorientadora: Celene Maria de Oliveira Simões Alves.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Monócitos -  
Teses. 4. Apoptose - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Alves,  
Celene Maria de Oliveira Simões, 1972-. III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas. IV. Título.

**Andressa da Silva Castro**

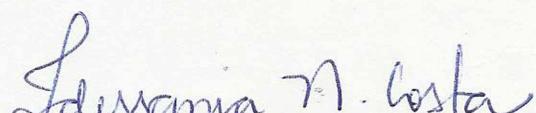
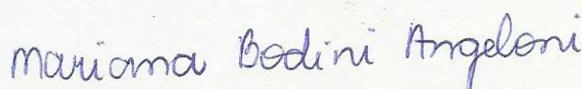
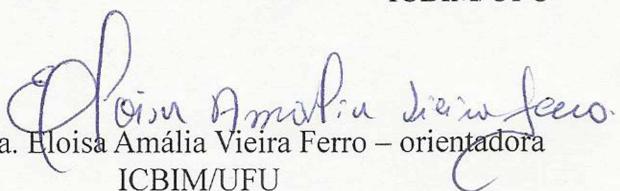
“Influência de células trofoblásticas BeWo e infecção por *Toxoplasma gondii* na modulação dos mecanismos de morte celular em células THP-1”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 17 de março de 2017.

  
Profa. Dra. Idessania Nazareth da Costa  
UEL  
Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes  
UFTM  
Profa. Dra. Mariana Bodini Angeloni  
PITÁGORAS  
Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa  
ICBIM/UFU  
Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro – orientadora  
ICBIM/UFU

**“ Adoro Reticências...**  
**Aqueles três pontos intermitentes**  
**Que insistem em dizer que nada está fechado,**  
**Que nada acabou,**  
**Que algo sempre está por vir!**  
**A vida se faz assim!**  
**Nada pronto, nada definido.**  
**Tudo sempre em construção.**  
**Tudo ainda por se dizer...**  
**Nascendo...**  
**Brotando...**  
**Sublimando...**  
**Vivo assim...**  
**Numa eterna reticência...**  
**Para que colocar ponto final?**  
**O que seria de nós sem a expectativa de continuação?”**

**(Nilson Furtado)**

## Dedicatória

Mais uma etapa vencida, mais um objetivo alcançado e mais uma vez a certeza de que com esforço e dedicação somos capazes de chegar onde queremos. Foram quatro anos de empenho, aprendizados, crescimento pessoal e profissional, amadurecimento científico, determinação e muita vontade de fazer o meu melhor. Agora a sensação é de alívio e, acima de tudo, gratidão. Gratidão à Deus por me permitir chegar até aqui, por me dar saúde e proteção, por colocar em meu caminho, para trilhar esta aventura ao meu lado, pessoas tão generosas e especiais e por ser sempre aquela voz dentro de mim a me dizer que no final tudo daria certo.

Dedico esta conquista aos meus grandes amores e incentivadores: minha família. Aos meus pais, **Luciano e Gorete**, por toda paciência e carinho. Por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a alçar voos cada vez maiores, por estarem ao meu lado em todos os momentos, sendo meu apoio e segurança. Vocês são minha base, meus melhores exemplos e a minha certeza de que nunca estarei só. À minha irmã que eu tanto amo...**Jane**, você é sinônimo de determinação e coragem. Te admiro muito por ser tão guerreira e disposta, por encarar de frente os desafios e sempre retirar deles o melhor aprendizado. Você é a melhor irmã desse mundo. Por fim, às minhas grandes e maiores alegrias... minhas sobrinhas lindas, **Beatriz e Luiza**. Vocês são luz na minha vida e donas dos meus melhores e mais sinceros sorrisos. Vocês chegaram para deixar os meus dias mais coloridos e a minha vida muito mais especial!!

**A vocês eu dedico todas as minhas vitórias e todo o meu amor!!**

## Agradecimentos especiais

**“Somos todos anjos de uma só asa, e só podemos voar quando nos abraçamos uns aos outros.”**

**(Fernando Pessoa)**

Esta frase resume bem este trabalho... Afinal, ele só pôde ser concluído porque tive ao meu lado pessoas dispostas a me ajudarem do início ao fim. Vocês fizeram toda a diferença nesta fase de minha vida e, por isso, agradeço imensamente ao carinho e colaboração de todos:

À minha orientadora, **Drª. Eloisa Amália Vieira Ferro**. Há exatos 10 anos fui aceita por você em seu laboratório, para fazer parte da sua equipe de pesquisa...desde o primeiro dia você me recebeu de braços abertos e aos poucos fui conquistando sua confiança e afeto. Hoje eu olho para trás e vejo o quanto aprendi nesses 10 anos e isto só foi possível porque você me apoiou, incentivou, ensinou, acalmou e cobrou, quando foi preciso. Muito obrigada por confiar em mim e no meu trabalho, por me dar liberdade para executá-lo, acreditando que eu não deixaria à desejar. Obrigada por ter sido a melhor professora que tive durante a graduação e por suas aulas terem despertado em mim a vontade de tê-la como minha orientadora, seguindo juntas, nesse caminho da pesquisa. Agradeço ainda, pelo carinho e cuidado de sempre. Nossa convivência e a liberdade que sempre me deu, me fizeram uma pessoa mais forte, segura e independente. Foi um grande prazer fazer parte de sua equipe e contar com sua orientação e amizade. Obrigada por tudo, sempre!

À minha co-orientadora, **Drª. Celene Maria de Oliveira Simões Alves**. Celeninha, obrigada pelas sugestões em relação à tese e pela amizade que é por toda a vida. Durante o mestrado aprendi muito com você e agora no doutorado, tentei colocar em prática estes ensinamentos. Por isso, o seu jeitinho está, de alguma forma, presente e impresso nestas páginas.

**Ao Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo.** Obrigada por, desde o mestrado, me ajudar e socorrer sempre que precisei. Por disponibilizar de tempo e boa vontade para me ajudar com as “benditas” citometrias de fluxo e se dispor a me auxiliar com as análises dos resultados e, ainda, obrigada pela forma como sempre me tratou, com receptividade, carinho e cuidado. Suas contribuições foram e serão sempre muito bem-vindas.

**Às Dras. Neide Maria Silva e Juliana Gonzaga de Oliveira.** Obrigada por terem disponibilizado de tempo para ler o trabalho e darem o melhor de vocês durante a banca de qualificação. Todas as sugestões que deram foram avaliadas com muita atenção e acrescentaram muito em nosso trabalho.

Aos membros da banca de defesa, **Dras. Idessânia Nazareth Costa, Angelica de Oliveira Gomes, Bellisa de Freitas Barbosa, Mariana Bodini Angeloni, Priscila Silva Franco e Dr. Henrique Tomaz Gonzaga.** Agradeço a todos por aceitarem o convite, por disporem de tempo para ler a tese e fazerem as contribuições necessárias para o aperfeiçoamento deste trabalho. **Idê**, foi você quem me indicou para trabalhar com a professora Eloisa. Obrigada pela amizade, carinho e por ter sido o meu primeiro elo de ligação com o restante do grupo. Mais que isso, obrigada por trazer tanta alegria e luz para nossas vidas. **Angel**, obrigada pela amizade sincera, pelas palavras sempre doces, por ser sempre tão generosa comigo e com todos. O seu nome foi feito pra você, porque você é realmente um anjo. Saiba que é um grande exemplo pra mim, pessoal e profissional. **Bê**, obrigada por todas as sugestões na banca de qualificação, por me ajudar na bancada, nas reconstituições de reagentes, na interpretação e discussão dos resultados. Você é a dedicação e disciplina em pessoa e admiro muito isso. Agradeço também pela amizade e companheirismo que sempre fortaleceram nossa relação. **Mari**, à você me faltam palavras...com você aprendi a dar os primeiros passos no laboratório e garanto que tive a melhor professora que poderia ter tido. Logo essa relação, inicialmente profissional, deu lugar a uma afinidade sem explicação, que resultou em uma grande amizade, a qual se estende desde então e me enche de orgulho e emoção. Obrigada por tudo, minha querida, por todos os ensinamentos científicos, pelas ajudas com as citometrias de fluxo, pelos conselhos sempre ponderados, por ser ouvido e abraço sincero todas as vezes que precisei e por estar sempre

pronta a me ajudar, independente da situação. **Pri** e **Zé**, infinitas vezes obrigada por fazerem parte da minha vida, por serem tão parceiros e me proporcionarem momentos de tanta alegria e diversão. Vocês são parte fundamental dos meus principais momentos de felicidade e sei que posso e sempre poderei contar com a amizade e o apoio de vocês.

Às minhas companheiras e, acima de tudo, amigas de laboratório: **Lê, Pri, Pâmela, Fer, Mayaritcha, Rafa e Iliana**. Vocês, na verdade, não são amigas de laboratório, são amigas de vida, são parte da família escolhida pelo meu coração. Este trabalho tem um pedacinho de cada uma de vocês, seja nas incansáveis citometrias de fluxo, nos trabalhosos blottings, ou na alegria, sorrisos e abraços do dia-a-dia. Vocês tornaram estes anos mais leves, foram parceiras de choros, gargalhadas e fofocas, foram a palavra amiga e o abraço acolhedor nos dias de desânimo. Tenho um orgulho imenso do nosso grupo e da relação de respeito e admiração que criamos umas pelas outras. Somos a prova de que “a união faz a força”. Muito obrigada a cada uma de vocês.

Aos companheiros de laboratório que estiveram presentes em algum momento deste trabalho e também contribuíram para sua execução: **Renata, Carol, Camilla, Matheus, Lara e Guilherme**. Obrigada pelo convívio e por ajudarem sempre que possível.

Aos colegas e amigos do **Laboratório de Imunopatologia** e do **Laboratório de Imunoparasitologia**, pela convivência e por todas as vezes que nos “doaram” células e parasitos.

À toda a equipe do **Laboratório de Histologia**, professores e técnicos. Obrigada pela convivência, pelas brincadeiras e por todo carinho e cordialidade.

À **Dra. Ana Cláudia Pajuaba**, pelas citometrias de fluxo.

Às secretárias da pós-graduação, **Lucileide** e **Lucélia**. Obrigada pela atenção, paciência e boa vontade com que sempre atenderam aos meus pedidos.

Aos **familiares** e **amigos**, que de perto ou de longe, torceram por mim, me enviaram vibrações de amor e carinho, disseram palavras de incentivo e me proporcionaram muitos momentos de descontração e alegria.

Aos órgãos de fomento: **CAPES, FAPEMIG** e **CNPq**, pelo financiamento do projeto.

**“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só e nem nos deixa sós; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.”**

**(Antoine Saint Exupéry)**

**Obrigada a todos vocês que cruzaram meu caminho, contribuíram para o meu crescimento e me ajudaram a ser uma pessoa melhor!!**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	15
1.2. Formas infectantes e ciclo de vida .....	18
1.3. Toxoplasmose .....	21
1.4. Resposta imune: hospedeiro <i>versus</i> parasito .....	23
1.5. Imunologia da gestação e interferência de <i>T. gondii</i> .....	25
1.6. Mecanismos de morte celular .....	29
1.7. Apoptose na interface materno-fetal e influência de <i>T. gondii</i> .....	32
1.8. Células BeWo e THP-1 como modelo de estudo para a toxoplasmose congênita .....	34
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivo Geral .....	38
3.2. Objetivos Específicos .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. Manutenção de células BeWo e THP-1 em cultura .....	39
4.2. Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i> em cultura .....	40
4.3. Tratamento de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo e posterior infecção com <i>T. gondii</i> .....	40
4.4. Índice de morte celular e índice de apoptose em células THP-1 por citometria de fluxo .....	42
4.5. Dosagem de citocinas no sobrenadante de células BeWo por ELISA .....	43
4.6. Índice de morte celular e índice de apoptose em células THP-1 estimuladas com sobrenadante neutralizado de células BeWo, por citometria de fluxo .....	44
4.7. Expressão de Fas/CD95 em células THP-1 por citometria de fluxo .....	46

<b>4.8. Detecção de Fas ligante solúvel (FasL) em sobrenadante de cultura de células BeWo e THP-1 por ELISA .....</b>	<b>47</b>
<b>4.9. Detecção de proteínas intracelulares (survivina, ERK1/2 fosforilada, P38, JNK, caspase 3 ativa associadas à apoptose em células THP-1 por Western blotting .....</b>	<b>48</b>
<b>4.10. Análise estatística .....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1. Fatores solúveis secretados por células trofoblásticas BeWo e, principalmente, infecção por <i>T. gondii</i> alteram os mecanismos de morte celular em células THP-1 .....</b>	<b>50</b>
<b>5.2. Infecção por <i>T. gondii</i> aumenta a secreção de MIF e diminui a secreção de TGF-β1 em células BeWo .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3. MIF e TGF-β1 secretados por células BeWo alteram os índices de morte celular em células THP- 1.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4. Fatores solúveis secretados por células BeWo e infecção por <i>T. gondii</i> alteram a expressão de de Fas/CD95 em células THP-1 .....</b>	<b>53</b>
<b>5.5. Infecção por <i>T. gondii</i> aumenta a secreção de Fas ligante solúvel por células THP-1 .....</b>	<b>54</b>
<b>5.6. Infecção por <i>T. gondii</i> diminui a expressão de ERK1/2 fosforilada em células THP-1 .....</b>	<b>55</b>
<b>5.7. Infecção por <i>T. gondii</i> diminui a expressão de caspase 3 ativa em células THP-1 .....</b>	<b>56</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>8. FIGURAS .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>104</b>

## RESUMO

Durante a gestação, o organismo materno é submetido à uma série de alterações imunológicas, necessárias para a manutenção do feto. Esta tolerância fetal é dependente das relações celulares que ocorrem na interface materno-fetal. Dessa forma, células trofoblásticas interagem com as células imunes, dentre elas os monócitos, e isto é determinante para o sucesso gestacional. Entretanto, como consequência deste processo de imunomodulação, o organismo materno se torna mais suscetível às infecções causadas por patógenos, como *Toxoplasma gondii*, e estes microrganismos interferem diretamente nas relações que se estabelecem entre essas células, podendo causar complicações gestacionais. Os mecanismos de morte celular que acometem as populações celulares presentes na interface materno-fetal são um dos fatores envolvidos na manutenção da gestação e, por isso, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de células trofoblásticas (linhagem BeWo) e infecção por *T. gondii* na modulação dos mecanismos de morte celular em monócitos (linhagem THP-1). Para isso, células THP-1 foram estimuladas ou não com sobrenadante de células BeWo (infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*) e posteriormente foram infectadas ou não com *T. gondii*. Foram analisados em células THP-1: os índices de morte celular e apoptose, a expressão de receptor de morte (Fas/CD95) e de proteínas intracelulares associadas à morte nestas células (survivina, ERK1/2 fosforilada, p38, JNK, caspase 3 ativa), secreção de Fas ligante (FasL) e a influência de alguns fatores solúveis secretados por células BeWo que têm a capacidade de interferir nestes mecanismos de morte celular em células THP-1. Os resultados demonstraram que ambos os sobrenadantes de células BeWo aumentaram o índice de morte celular em células THP-1 não-infectadas, mas apenas o sobrenadante de células BeWo infectadas alterou este índice de morte em células THP-1 infectadas, reduzindo-o. Além disso, células THP-1,

quando infectadas, apresentaram índice de morte celular maior do que células THP-1 não-infectadas. Ambos os sobrenadantes de células BeWo induziram aumento na expressão de fosfatidilserina em células THP-1 não-infectadas e células THP-1, quando infectadas, expressaram menos fosfatidilserina do que células THP-1 não-infectadas. Fator de inimigração de macrófago (MIF) e fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ 1, secretados por células BeWo, atuaram na indução de morte celular em células THP-1 não-infectadas, enquanto que, apenas TGF- $\beta$ 1 interferiu na morte de células THP-1 infectadas, inibindo-a. Além disso, estes dois fatores solúveis mostraram-se capazes de diminuir a expressão de fosfatidilserina em células THP-1 não-infectadas, mas apenas TGF- $\beta$ 1 alterou esta expressão em células THP-1 infectadas. Células THP-1 infectadas expressaram mais Fas/CD95 do que células THP-1 não-infectadas. Em células THP-1 não-infectadas, a expressão de Fas/CD95 foi maior quando estas células foram estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo e em células THP-1 infectadas este fenômeno só se repetiu quando elas foram estimuladas com o sobrenadante de células BeWo infectadas. A secreção de FasL foi maior em células THP-1 infectadas, mas em células BeWo, a infecção não alterou a secreção deste ligante. As proteínas intracelulares, ERK1/2 fosforilada e caspase 3 ativa, foram menos expressas em células THP-1 infectadas e ambos os sobrenadantes de células BeWo induziram a diminuição da expressão de caspase 3 ativa em células THP-1, infectadas e não-infectadas. Assim, nossos resultados mostraram que células trofoblásticas BeWo modulam os mecanismos de morte celular em células THP-1 e estas alterações podem estar associadas à manutenção e sucesso da gestação. Além disso, a infecção por *T. gondii* também altera estas interações celulares que ocorrem na interface materno-fetal.

**Palavras chaves:** células trofoblásticas, monócitos, mecanismos de morte celular, apoptose, *Toxoplasma gondii*.

## ABSTRACT

During pregnancy, maternal organism is submitted to immunological alterations, which are necessary to fetus maintenance. This fetal tolerance depends on the cell interactions that occur at maternal-fetal interface. Therefore, trophoblast cells interact with immune cells, as monocytes, and it is determinant for gestational success. However, in consequence of this immunomodulation process, the maternal organism becomes more susceptible to infections by pathogens, such as *Toxoplasma gondii*, which interfere directly in the crosstalk between trophoblast cells and monocytes, causing pregnancy complications. Mechanisms of cell death that occurs in cell populations present at maternal-fetal interface are involved in the gestational development and, in this way, this study aimed to evaluate the influence of trophoblast cell (BeWo line) and *T. gondii* infection in the modulation of death mechanisms in monocytes (THP-1 line). For this, THP-1 cells were stimulated or not with supernatants of BeWo cells (infected or uninfected with *T. gondii*) and then infected with *T. gondii*. In THP-1 cells were analyzed: the index of cell death and apoptosis, the expression of death receptor (Fas/CD95) and intracellular proteins associated to death in these cells (survivin, phosphorylated ERK1/2, p38, JNK, active caspase 3), human Fas ligand (FasL) secretion and the influence of soluble factors secreted with BeWo cells, which have the capacity to interfere in these mechanisms of THP-1 cell death. The results showed that supernatants of BeWo cells induced the increase of the index of cell death in uninfected THP-1 cells, but only supernatant of infected BeWo cells altered this index in infected THP-1 cells, reducing it. Moreover, infected THP-1 cells presented cell death index higher than uninfected THP-1 cells. Both supernatants of BeWo cells induced increased in the expression of phosphatidylserine in uninfected THP-1 cells and infected THP-1 cells expressed less phosphatidylserine than uninfected THP-1 cells. Macrophage

migration inhibitory factor (MIF) and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1), both secreted by BeWo cells, actuated in the induction of cell death in uninfected THP-1 cells, but only TGF- $\beta$ 1, interfered in the cell death of infected THP-1 cells, inhibiting it. Furthermore, both of these soluble factors were able to decrease the expression of phosphatidylserine in uninfected THP-1 cells, but only TGF- $\beta$ 1 altered this expression in infected THP-1 cells. The expression of Fas/CD95 was higher in infected THP-1 cells than uninfected THP-1 cells. In uninfected THP-1 cells, Fas/CD95 expression was higher when these cells were stimulated with supernatants of BeWo cells and in infected THP-1 cells, this phenomenon was repeated in those that were stimulated with supernatant of infected BeWo cells. The secretion of FasL was higher in infected THP-1 cells, but in BeWo cells, the infection did not alter the secretion of this ligand. Both intracellular proteins analyzed, phosphorylated ERK1/2 and active caspase 3 were less expressed in infected THP-1 cells and both supernatants of BeWo cells, induced decreased of active caspase 3 expression in uninfected and infected THP-1 cells. These results showed that BeWo trophoblast cells modulate mechanisms of cell death in THP-1 cells and these alterations can be associated with the maintenance and success of pregnancy. Furthermore, *T. gondii* infection also interferes in these cell interactions which occur in the maternal-fetal interface.

**Keywords:** trophoblast cells, monocytes, mecanismos de morte celular, apoptose, *Toxoplasma gondii*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário, parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar um amplo espectro de hospedeiros, que incluem todos os animais homeotérmicos, tendo sido isolado em mamíferos e aves em todos os continentes (NEVES, 2002; HUNTER; SIBLEY, 2012; FOUROTAN-RAD *et al.*, 2016). Trata-se de um protozoário cosmopolita de alta prevalência e estima-se que cerca de um terço da população humana global esteja infectada com *T. gondii* (HIDE, 2016).

O parasito foi primeiramente identificado em dois países diferentes, no ano de 1908. Por Nicolle e Manceaux na Tunísia (África), em um roedor, *Ctenodactylus gundi* e, em São Paulo (Brasil), por Splendore em coelhos, sendo o gênero e a espécie introduzidos em 1909 por Nicole e Manceaux (REY, 2001; KAWAZOE, 2005). Pertence ao Filo Apicomplexa, o qual compreende mais de 5000 espécies, incluindo patógenos de importância clínica e econômica (JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2016).

Morfologicamente *T. gondii* possui estrutura arqueada, núcleo situado no meio do corpo ou mais próximo da extremidade posterior, membrana externa simples e membrana interna dupla e todas as organelas de células eucariontes, dentre outras que são particularidades do parasito (REY, 2001). Na região anterior do parasito localiza-se o complexo apical constituído por organelas características de indivíduos pertencentes ao filo Apicomplexa, como: conóide, anel polar, microtúbulos subpeliculares e as roptrias, micronemas e grânulos densos que secretam proteínas essenciais no processo de reconhecimento, adesão e invasão da célula hospedeira, tornando-se essenciais no sucesso do parasitismo (BLADER; SAEIJ, 2009; PENG *et al.*, 2011; JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2016, BASTOS *et al.*, 2016).

As micronemas são responsáveis pela secreção de moléculas adesivas, denominadas proteínas micronemais transmembranas (TM-MICs), que agem no reconhecimento e na

adesão inicial do parasito aos receptores da superfície da célula hospedeira. Pelo menos 20 tipos de proteínas secretadas pelas micronemas já foram descritos (ZHOU *et al.*, 2005; BLADER; SAEIJ, 2009) e dentre eles, MIC1, MIC2, MIC4, MIC6 e MIC8 são essenciais nos processos de adesão parasitária (LIU *et al.*, 2010; SHEINER *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que MIC2 é capaz de ligar-se às moléculas de adesão presentes na superfície da célula hospedeira, propiciando a migração de *T. gondii* para tecidos, inclusive os imunologicamente privilegiados, como o cérebro, a retina e a placenta, promovendo a disseminação mais rápida do parasito no organismo hospedeiro (BARRAGAN *et al.*, 2005). Já MIC3, um tipo de micronema expressa durante todos os estágios do ciclo de vida de *T. gondii*, além de participar dos processos de reconhecimento e adesão da célula hospedeira, está relacionada com a virulência do parasito, uma vez que, parasitos geneticamente modificados para o gene de MIC3, apresentaram virulência reduzida (WANG; YING, 2015).

Após o reconhecimento da célula hospedeira pelo parasito e adesão à mesma, ocorre a secreção de proteínas derivadas das roptrias, as quais atuam aumentando a fluidez da membrana plasmática da célula hospedeira, facilitando a internalização do parasito (KIM; WEISS, 2004; BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008; GUBBELS; DURAISINGH, 2012). Além disso, as proteínas secretadas pelas roptrias também relacionam-se com a virulência do parasito e sua capacidade patogênica (SHWAB *et al.*, 2016). Assim, ROP18, ROP5, ROP16 e ROP17, comprovadamente, estão envolvidas na interação parasito-hospedeiro e na patogênese em camundongos. Dessa forma, estudos mostram que ROP18 e ROP5 são proteínas fundamentais de virulência em murinos e que ROP18 é secretada por isolados de *T. gondii* de alta patogenicidade, além de estar associada à inibição da via intrínseca da apoptose em estudos *in vitro* (SAEIJ *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2006; BRADLEY; SIBLEY, 2007; BEHNKE *et al.*, 2011; REESE *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2016). ROP16 é importante na modulação da resposta immune do hospedeiro à invasão do parasito em

camundongos (YAMAMOTO *et al.*, 2009; ONG *et al.*, 2010) e, mais recentemente, ROP17 foi descrita com capacidade de interagir com ROP5 e evitar a eliminação do parasito pelas células hospedeiras (ETHERIDGE *et al.*, 2014).

Os grânulos densos estão associados à manutenção e crescimento do parasito dentro do vacúolo parasitóforo, o qual é formado pela própria membrana plasmática da célula hospedeira após o processo de invasão (NEVES, 2003; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; PLATTNER; SOLDATI-FAVRE, 2008). São responsáveis por garantir uma fonte de nutrição ao parasito, sendo que, estudos demonstraram que *T. gondii* usa GRA-7 para redirecionar o transporte de nutrientes da célula hospedeira em direção ao lúmen do vacúolo parasitóforo (COPPENS *et al.*, 2006). Além disso, os grânulos densos impedem a ligação de lisossomos ao vacúolo, auxiliando na evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

De acordo com as características genéticas que possuem, isolados de *T. gondii* foram divididos em diferentes grupos, denominados cepas, as quais podem ser de dois tipos: clonais ou recombinantes (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG *et al.*, 2004). As cepas clonais podem ser de três linhagens (tipo I, II e III) e, apesar de serem muito semelhantes geneticamente, podem ser discriminadas em camundongos de acordo com sua virulência (DARDÉ, 2008; SHWAB *et al.*, 2014). A ativação das vias de sinalização dentro da célula também variam dependendo da cepa do parasito (BLADER; SAEIJ, 2009). Dessa forma, de acordo com seu desenvolvimento e manutenção no hospedeiro, as cepas podem ser de alta, moderada ou baixa virulência (MORDUE *et al.*, 2001; SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Cepas clonais tipo I (RH, CAST e VEL) são consideradas muito virulentas, pois a multiplicação intracelular de taquizoítas é rápida, enquanto a formação de cistos, quando ocorre, é lenta. Além disso, em camundongos, cepas tipo I induzem uma super produção de

citocinas inflamatórias que levam a sérios danos teciduais, podendo comprometer a sobrevivência do hospedeiro (MORDUE *et al.*, 2001; GAVRILESCU; DENKERS, 2001; REY, 2001; NGUYEN *et al.*, 2003; AJZENBERG, 2010). Ainda, experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que parasitos da cepa tipo I apresentam melhor capacidade migratória através das barreiras celulares, contribuindo para sua virulência. (BARRAGAN; SIBLEY, 2002). Ao contrário, cepas tipo II (ME49) e III (VEG) são menos virulentas, apresentando moderada ou baixa virulência em camundongos, respectivamente (SAEIJ *et al.*, 2007) . São caracterizadas pela multiplicação mais lenta de taquizoítas e formação mais rápida de cistos teciduais, tendendo à cronificação (REY, 2001; BLADER; SAEIJ, 2009).

Em humanos, as três linhagens causam doenças e a virulência das cepas é um dos fatores que determina o caráter patogênico das mesmas (SUZUKI *et al.*, 1989). Cepas tipo I geralmente estão mais associadas com as infecções oculares adquiridas após o nascimento, enquanto que cepas tipo II estão mais associadas com infecções congênitas, encefalites toxoplásmicas e em infecções que acometem pacientes imunocomprometidos (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; MONTOYA; LIENSENFELD, 2004; BLADER; SAEIJ, 2009).

As cepas recombinantes são aquelas cujos genótipos diferem dos identificados nas cepas clonais, ou então, são constituídas por uma mistura genética entre os genótipos já descritos (BOOTHROYD, GRIGG, 2002; VILLENA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2016). São comumente encontradas em locais com ampla variedade de hospedeiros para *T. gondii*, como Brasil e países africanos, e estão mais associadas às formas clínicas graves de toxoplasmose ocular (AJZENBERG *et al.*, 2002; BOOTHROYD, GRIGG, 2002).

## 1.2. Formas infectantes e ciclo de vida

*Toxoplasma gondii* pode ser encontrado em três diferentes formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os taquizoítas (*tachis* = rápido) possuem formato crescente ou oval e representam o estágio de multiplicação rápida do parasito. São encontrados dentro do vacúolo parasitóforo de diversas células, como células do sistema mononuclear fagocitário, células hepáticas, musculares, nervosas e também livres nos líquidos orgânicos e excreções, após lise celular (NEVES, 2003; TENTER, 2009). Após repetidas replicações, por meio de um processo denominado endodiogenia, células infectadas pelos taquizoítas se rompem e a forma infectante fica livre para invadir, rapidamente, células vizinhas (NEVES, 2003; MONTOYA; LIENSENFELD, 2004; SKARIAH *et al.*, 2010). Devido a esta capacidade de multiplicação e disseminação rápida, os taquizoítas representam as formas encontradas durante a fase aguda da infecção e são responsáveis pelas manifestações clínicas da toxoplasmose, sendo também denominadas formas proliferativas (NEVES, 2003; MONTOYA; LIENSENFELD, 2004; DUBEY, 2008; HUNTER; SIBLEY, 2012; IHARA; NISHIKAWA, 2014; WHITE *et al.*, 2014).

Mecanismos imunológicos do hospedeiro são responsáveis pela diminuição da quantidade de parasitos circulantes, bem como pela diferenciação de taquizoítas em bradizoítas no interior de cistos teciduais (IHARA; NISHIKAWA, 2014; WHITE *et al.*, 2014). Os bradizoítas (*brady* = lento) são morfologicamente semelhantes aos taquizoítas, porém, se multiplicam mais lentamente e expressam algumas moléculas estágio-específicas (NEVES, 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY *et al.*, 2012). Estão presentes, principalmente, em tecidos nervosos e musculares esqueléticos e cardíacos e possuem maior resistência à ação da tripsina e da pepsina, podendo permanecer viáveis nos tecidos por vários anos, caracterizando a fase crônica da infecção (NEVES, 2003; ELMORE *et al.*, 2010; IHARA; NISHIKAWA, 2014; WHITE *et al.*, 2014). No entanto, quando o sistema

imunológico do hospedeiro encontra-se debilitado, a infecção pode passar por um processo de reagudização e os bradizoítas voltam à forma taquizoíta de multiplicação e disseminação rápida. (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH *et al.*, 2010; HARKER *et al.*, 2015). A alternância entre os estágios de taquizoítas e bradizoítas é um fator importante para que o parasito consiga completar seu ciclo de vida e permaneça vivo nas células dos hospedeiros intermediários (LUN *et al.*, 2015).

A terceira forma infectante refere-se aos esporozoítas, os quais são encontrados em oocistos presentes nas fezes dos felídeos. Estes oocistos possuem parede dupla resistente ao meio e são liberados pelos felídeos entre 7 – 21 dias, após terem sido ingeridos. Ao serem liberados, ainda são imaturos, porém, sob condições favoráveis do meio ambiente, passam por um processo de esporulação que resulta em um oocisto contendo em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, tornando-se, pois, infectantes (DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; WHITE *et al.*, 2014).

*Toxoplasma gondii* possui ciclo de vida complexo e heteroxeno, necessitando de mais de um hospedeiro para que ele se complete (DUBEY, 2004). Felídeos dos gêneros *Felix* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos do parasito, onde ocorre a fase sexuada do ciclo, com consequente formação dos oocistos, seguida de sua liberação no ambiente. Já outros mamíferos, incluindo o ser humano e as aves, são os hospedeiros intermediários de *T. gondii* e é neles que ocorre a fase assexuada do ciclo (DUBEY, 1998; NEVES, 2003; LUN *et al.*, 2015).

Os felídeos se infectam ao ingerir alguma das formas infectantes (taquizoítas, cistos contendo bradizoítas ou oocistos contendo esporozoítas). No epitélio intestinal desses animais, sob ação enzimática, quando necessária, todas as formas infectantes se modificam, convertendo-se em taquizoítas, os quais iniciam um processo de multiplicação rápida por

endodiogenia e merogonia, originando os merozoítos (DUBEY, 2004; NEVES, 2003; HUNTER; SIBLEY, 2012; WHITE *et al.*, 2014). Estes por sua vez, são liberados após o rompimento das células parasitadas e penetram em novas células epiteliais, transformando-se nas formas sexuadas masculinas ou femininas, que após maturação formarão os gametas masculinos, ou microgametas (biflagelados e móveis) e os gametas femininos, ou macrogametas (imóveis). Os microgametas saem da célula onde estão e locomovem-se até a célula onde se encontram os macrogametas, fecundando-os e dando origem ao ovo ou zigoto, que será envolto por uma parede externa dupla, resultando no oocisto (DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; WHITE *et al.*, 2014).

Os hospedeiros intermediários podem adquirir a infecção por diferentes vias: ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais com bradizoítas no seu interior; ingestão de água, frutas e verduras contaminadas por oocistos; contato com taquizoítas a partir de líquidos orgânicos, como leite, saliva e esperma; infecção congênita; transfusão sanguínea; transplante de órgãos e, até mesmo, por acidentes laboratoriais (MONTOYA; LIESENFELD; 2004; BLADER; SAEIJ, 2009; SILVA; LANGONI, 2009; DUBEY *et al.*, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013; CHAUDHRY *et al.*, 2014). Qualquer uma destas formas, após passar pelas barreiras epiteliais do hospedeiro, se transforma em taquizoítas e inicia um processo de intensa multiplicação, que culminará no rompimento destas células, invasão de outros tipos celulares e consequente disseminação do parasito (PENG *et al.*, 2011; WHITE *et al.*, 2014).

### **1.3. Toxoplasmose**

A infecção por *T. gondii* causa a toxoplasmose, uma das protozoonas mais bem estabelecidas mundialmente (PENG *et al.*, 2011; CHAUDHRY *et al.*, 2014). No Brasil,

estima-se que a toxoplasmose acomete cerca de 50 a 80% da população, mas esta prevalência varia de acordo com as condições ambientais, região geográfica, os hábitos culturais, alimentares e de higiene de cada local (RORMAN *et al.*, 2006; GALISTEU *et al.*, 2007; DUBEY *et al.*, 2012; SEPULVEDA-ARIAS *et al.*, 2014).

Em humanos imunocompetentes, a toxoplasmose geralmente ocorre como uma infecção latente e, dessa forma, cursa de forma assintomática ou subclínica (RORMAN *et al.*, 2006; BLADER; SAEIJ, 2009; LANG *et al.*, 2007; CHAUDHRY *et al.*, 2014). Isto ocorre porque a resposta imune do hospedeiro é capaz de conter a rápida multiplicação dos parasitos, conduzindo a fase aguda da doença para um estágio de cronicidade (SEPULVEDA-ARIAS *et al.*, 2014). Entretanto, a infecção pode ser potencialmente grave em pacientes imunocomprometidos, nos quais pode ocorrer a reagudização da infecção, com rápida multiplicação e disseminação do parasito, e quando o parasito é adquirido de forma congênita (RORMAN *et al.*, 2006; BLADER; SAEIJ, 2009; MACHALA *et al.*, 2015).

A transmissão vertical da toxoplasmose ocorre quando a mulher adquire a infecção durante a gestação e encontra-se na fase aguda desta infecção (REMINGTON *et al.*, 2001; KODJIKIAN, 2010), ou quando a infecção materna ocorre antes da concepção (VOGEL *et al.*, 1996; CHEMLA *et al.*; 2002, BARBOSA *et al.*, 2007; CHAUDHRY *et al.*, 2014). Na toxoplasmose congênita, o parasito é capaz de migrar através da placenta e se replicar dentro de diferentes tecidos do feto ou embrião (LANG *et al.*, 2007; KODJIKIAN, 2010). Além disso, mulheres infectadas cronicamente, quando imunodeprimidas, também podem sofrer a reagudização da doença e posterior infecção placentária e fetal ou, como demonstrado em camundongos, quando fêmeas são reinfectadas com cepas diferentes daquelas da infecção prévia (RORMAN *et al.*, 2006; MONTOYA; REMINGTON, 2008; FRANCO *et al.*, 2015).

Estudos afirmam que a infecção por *T. gondii* é uma das principais causas de atrasos no desenvolvimento fetal intrauterino e manifesta-se em diferentes graus de gravidade

dependendo da virulência da cepa do parasito, da capacidade de resposta imune da mãe e do período gestacional em que a mulher se encontra (SPALDING *et al.*, 2003; KONG *et al.*, 2015). Sendo assim, o risco de transmissão vertical aumenta com o progredir da gestação, mas as consequências para o feto, em decorrência dessa transmissão, tendem a ser maiores quanto mais precoce se dá a infecção, podendo variar desde complicações gestacionais e má formação fetal até nascimentos prematuros, natimortos ou abortos (GOMES *et al.*, 2011; GALVAN-RAMIREZ *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2015).

Estima-se que em países desenvolvidos, aproximadamente 1 em cada 10.000 recém-nascidos são afetados pela toxoplasmose congênita, enquanto no Brasil, estima-se que a doença atinja uma média de 3 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (LAGO *et al.*, 2007; CARLIER *et al.*, 2012; KONG *et al.*, 2015).

#### **1.4. Resposta imune: hospedeiro *versus* parasito**

A resposta imune contra *T. gondii* é mediada por mecanismos da imunidade inata e adaptativa, sendo que a principal forma de controle do parasito é feita por uma resposta imune celular e do tipo pró-inflamatória, por meio de atividades citotóxicas e secreção de citocinas (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; GADDI; YAP, 2007; HUNTER; SIBLEY, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014). Dessa forma, diferentes células participam deste processo de defesa, como células apresentadoras de抗ígenos (células dendríticas e macrófagos), células *natural killer* (NK), leucócitos polimorfonucleares e linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; FILISETTI; CANDOLFI, 2004; WILSON *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2015).

Linfócitos TCD8<sup>+</sup> desempenham função citotóxica essencial para o controle do parasitismo, e estudos demonstram que a ausência dessa subpopulação celular acelera a mortalidade em camundongos infectados com *T. gondii*, comprovando a importante função

desempenhada por células TCD8<sup>+</sup> no combate do parasito e sobrevivência do hospedeiro (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; MELO *et al.*, 2011). Os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, por sua vez, regulam diferentes mecanismos imunes contra o parasito e, depois de estimulados, se diferenciam em subpopulações de linfócitos *T helper*, como por exemplo, linfócitos *T helper* 1 (Th1), linfócitos *T helper* 2 (Th2), linfócitos *T helper* 17 (Th17) e células T reguladoras (Treg), os quais diferem uns dos outros segundo o perfil de citocinas que secretam (COMBE *et al.*, 2005; JONGERT *et al.*, 2010).

Células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como interferon (IFN)- $\gamma$ , fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), interleucina (IL)-6, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), as quais são responsáveis pela resposta imune efetora contra *T. gondii* (ABOU-BACAR *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2013; FEREIG; NISHIKAWA, 2016). Células Th17 secretam IL-17A, uma citocina pró-inflamatória que desempenha função importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (KELLY *et al.*, 2005; PASSOS *et al.*, 2010). Já as células Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-13 e IL-5 (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004) e as células Treg secretam IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ , que são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade citotóxica de células NK e a maturação de células dendríticas (SAKAGUCHI, 2005; AKBAR *et al.*, 2007).

Os monócitos também assumem função importante na resposta imune contra *T. gondii*. Após se diferenciarem em macrófagos, eles atuam como células apresentadoras de抗ígenos e, através da fagocitose e apresentação de抗ígenos aos linfócitos, secretam IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  que ativam e auxiliam as células da imunidade adaptativa (HUNTER; SIBLEY, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014). Dessa forma, IL-12 produzida pelos macrófagos, induz os linfócitos a secretarem IFN- $\gamma$ , que estimula vários mecanismos intracelulares capazes de inibir a multiplicação do parasito

(MELO *et al.*, 2011; STURGE; YAROVINSKY, 2014). A presença de IFN- $\gamma$ , por exemplo, regula a expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e espécies reativas do oxigênio (ROS) por macrófagos, que são fatores tóxicos importantes para a eliminação do parasito (STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014).

Uma vez dentro da célula hospedeira, o parasito desenvolve mecanismos capazes de modular o funcionamento dessas células e conduzir à cronicidade da infecção, tornando-se apto a evadir à resposta imune do hospedeiro e garantir sua sobrevivência (DENKERS, 2003; BLADER; SAEJI, 2009; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). Dentre estes mecanismos, destaca-se a capacidade que *T. gondii* possui de interferir nas vias de sinalização intracelulares e dessa forma, alterar o padrão de citocinas secretadas. Isto ocorre, por exemplo, quando os抗ígenos parasitários inibem a translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo celular, provocando a diminuição da secreção de IL-12 e TNF- $\alpha$  (SHAPIRA *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2010). *Toxoplasma gondii* também é capaz de induzir a ativação da via de sinalização STAT-3, a qual está envolvida na regulação de genes supressores de citocinas pró-inflamatórias (BUTCHER *et al.*, 2005; BUTCHER *et al.*, 2011). Além disso, o parasito pode alterar a expressão de moléculas de MHC II em células apresentadoras de抗ígeno, comprometendo a apresentação de抗ígenos parasitários aos linfócitos (LANG *et al.*, 2007; LÜDER *et al.*, 2009), modular a expressão e produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), essencial para a síntese de óxido nítrico (LÜDER *et al.*, 2003) e interferir nos processos de morte celular programada. Neste sentido, *T. gondii* induz a morte de células de defesa e impede a apoptose de células infectadas, mantendo-se viável nas células hospedeiras (LANG *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2016).

### **1.5. Imunologia da gestação e interferência de *T. gondii***

No curso da gestação, é preciso que ocorram alterações físicas e, principalmente, imunológicas capazes de permitir a implantação embrionária e a manutenção do conceito. Estas modificações ocorrem por meio de um processo de imunomodulação que torna o microambiente gestacional fisiologicamente anti-inflamatório (KONG *et al.*, 2015).

Entretanto, apesar de ser geralmente definida como uma condição predominantemente anti-inflamatória, estudos indicam que a gestação é mantida por um balanço entre perfis de resposta Th1 e Th2, que variam ao longo do período gestacional e resultam em três fases imunológicas distintas (FEST *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2015). No início da gestação, há um perfil preferencialmente pró-inflamatório, com aumento na produção de quimiocinas e citocinas do tipo Th1, importantes no processo de invasão do trofoblasto e implantação do blastocisto no endométrio, bem como as modificações das artérias espiraladas que garantem a nutrição do embrião em desenvolvimento (NARUSE *et al.*, 2010). O período médio da gestação caracteriza-se por ser uma fase de tolerância imunológica, com um perfil preferencialmente anti-inflamatório. Por fim, o estágio final da gestação é marcado pelo reestabelecimento de uma reação inflamatória, necessária para o mecanismo do parto (KOGA *et al.*, 2009).

Células do sistema imune inato possuem papel importante durante o período gestacional. Neste sentido, durante o primeiro trimestre gestacional, células NK são uma das principais populações celulares presentes na decídua, concentrando-se próximas às artérias espiraladas, sendo comprovadamente importantes na invasão do trofoblasto no endométrio e na angiogênese (ZHANG *et al.*, 2015). Células dendríticas são importantes no estabelecimento de um microambiente tolerogênico na interface materno-fetal, induzindo a expansão e manutenção de células T reguladoras (PLAKS *et al.*, 2008; BARRIENTOS *et al.*, 2009; AMODIO *et al.*, 2013). Os monócitos, por sua vez, são uma das primeiras células observadas no sítio de implantação e, após se diferenciarem em macrófagos, são importantes

na manutenção da homeostase tecidual, por meio da fagocitose de células em apoptose e de debríis celulares presentes neste ambiente (HANNA *et al.*, 2006; KOGA *et al.*, 2009).

Estudos têm demonstrado que os monócitos representam a população de leucócitos predominante no sítio de implantação do blastocisto e, no microambiente placentário, a quantidade dessas células imunes inatas aumenta ao longo da gestação. Este acúmulo de monócitos no microambiente placentário se deve, principalmente, à ação das células trofoblásticas, que secretam citocinas e quimiocinas capazes de regular a migração e diferenciação de monócitos na interface materno-fetal (FEST *et al.*, 2007; KOGA *et al.*, 2009). Dessa forma, os monócitos presentes neste microambiente exibem um perfil de resposta diferente daqueles que não tiveram contato prévio com o trofoblasto, e podem secretar tipos e quantidades diferentes de citocinas, além de tornarem-se mais ou menos susceptíveis a possíveis infecções por patógenos (FEST *et al.*, 2007; KOGA *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2013; FAAS *et al.*, 2014).

Células da imunidade adaptativa também são de fundamental importância na interface materno-fetal, em particular as células T reguladoras. Estudos demonstram que complicações gestacionais graves podem estar associadas a distúrbios na quantidade desta população celular, uma vez que, em casos de abortos espontâneos, o número de células T reguladoras presentes na decidua é menor do que em casos em que a gestação cursa de forma normal (RANGO, 2008).

Assim, pelo fato da tolerância fetal ser mantida por uma resposta imune predominantemente anti-inflamatória, o organismo materno, durante a gestação, torna-se um microambiente imunologicamente privilegiado e suscetível ao estabelecimento, desenvolvimento e disseminação de alguns patógenos, como por exemplo *T. gondii* (REMINGTON *et al.*, 2001; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; KODJIKIAN, 2010; SYKES *et al.*, 2012). Além disso, a influência hormonal no sistema imunológico também contribui

com a maior susceptibilidade de gestantes à toxoplasmose, aumentando o risco de infecção placentária e transmissão congênita (KRAVETZ, 2010; MUÑOZ *et al.*, 2011). Neste sentido, estudos já demonstraram que durante o segundo e terceiro trimestres gestacionais há um significativo aumento de estradiol e progesterona, concomitante ao aumento da susceptibilidade de tecidos placentários e fetais à infecção por *T. gondii*, e que, hormônios como estrógeno e progesterona, modulam a reatividade das células T e a produção de citocinas de perfil Th2 (LANG *et al.*, 2007; VARGAS-VILLAVICENCIO *et al.*, 2009; KUMAR; MAGON, 2012).

Dessa forma, a presença de *T. gondii* na interface materno-fetal gera um desequilíbrio imunológico que pode resultar em problemas na gestação ou até mesmo abortos, uma vez que, na tentativa de controlar a infecção, o hospedeiro desenvolve uma resposta tipicamente pró-inflamatória que, consequentemente, altera o perfil anti-inflamatório e tolerogênico, característico na interface materno-fetal (LUPPI, 2003; LOPES *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2015).

Estudos clínicos demonstram uma forte associação entre complicações gestacionais e infecções intrauterinas, como resultado da interação entre células trofoblásticas e células do sistema imune inato (LAMONT, 2003; ESPINOZA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2015). A expressão de receptores específicos no trofoblasto é um dos fatores que desencadeia esse desequilíbrio imunológico, uma vez que eles são capazes de reconhecer a presença de bactérias, vírus, parasitos, células em apoptose e tecidos danificados. Após este reconhecimento, o trofoblasto secreta citocinas que vão agir sobre as células imunes presentes na decídua, influenciando na resposta dessas células frente ao patógeno (KOGA *et al.*, 2009).

Sendo assim, o sucesso gestacional está diretamente relacionado à secreção equilibrada de citocinas pró- e anti-inflamatórias e da relação estabelecida entre as células trofoblásticas e

as células do sistema imunológico materno, principalmente quando isto ocorre concomitante a algum tipo de infecção.

### **1.6. Mecanismos de morte celular**

A necrose e a apoptose são os dois principais tipos de morte celular já estudados, e a ocorrência e o controle de ambos os mecanismos interferem diretamente na sobrevivência dos organismos (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). A necrose geralmente medeia a morte celular em resposta a danos mais intensos, como por exemplo em casos de hipotermia e hipóxia, ou em decorrência de patologias (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE *et al.*, 1980). Neste processo, as células perdem a integridade da membrana plasmática, seguida de edema citoplasmático e mitocondrial, lise celular, extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas (CURTIN *et al.*, 2002). Em consequência disto, macrófagos circulantes e glóbulos brancos são atraídos para o tecido danificado com a finalidade de digerirem as células necrosadas e isto resulta em uma resposta inflamatória capaz de comprometer ou, até mesmo, matar as células e tecidos vizinhos (CURTIN *et al.*, 2002).

A apoptose é um processo de morte celular programada que interfere diretamente nos mecanismos de desenvolvimento, homeostase e imunidade tecidual, sendo responsável pela remoção de células tumorais e células danificadas e pela seleção do repertório linfocitário, além de exercer importante função na defesa contra patógenos intracelulares (HEUSSLER *et al.*, 2001; LÜDER *et al.*, 2001, STRASSER *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012; JORQENSEN *et al.*, 2017). Dessa forma, distúrbios na regulação do processo apoptótico contribuem para a ocorrência de diversos eventos patológicos, como câncer, doenças autoimunes, infecções e desordens degenerativas (STRASSER *et al.*, 2011).

Durante a apoptose, as células morrem sem que haja lise e extravasamento do conteúdo intracelular, evitando a ocorrência de uma resposta imune exacerbada capaz de comprometer

o funcionamento das células vizinhas (STRASSER *et al.*, 2011; HAPPO *et al.*, 2012). Assim, células em processo apoptótico sofrem uma série de mudanças morfológicas que culminam na sua eliminação. Inicialmente, estas células apresentam alterações na membrana, com consequente exposição de fosfatidilserina (PS). Posteriormente, ocorre a condensação da cromatina, fragmentação nuclear, clivagem do DNA, desintegração celular e formação de corpos apoptóticos (STRASSER *et al.*, 2011). Este conjunto de modificações morfológicas faz com que as células em apoptose liberem sinais, como a exposição de fosfatidilserina, que as tornam facilmente detectadas por células fagocíticas, como os macrófagos e células dendríticas, atraindo estas populações celulares para o sítio onde as células estão morrendo (STRASSER *et al.*, 2011; HAPPO *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2015). Dessa forma, as células fagocíticas atraídas, englobam os corpos apoptóticos removendo-os e impedindo a ativação de uma resposta inflamatória (STRASSER *et al.*, 2011; HAPPO *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2015).

O processo apoptótico é mediado por enzimas denominadas caspases, as quais estão presentes no citoplasma celular e são produzidas como precursores inativos, ou seja, na forma de pró-enzimas. Para se tornarem ativas, as caspases precisam ser dimerizadas, no caso das caspases iniciadoras, ou clivadas por meio de proteólise, no caso das caspase efetoras, e, então, uma vez ativadas, se tornam capazes de clivar seu substrato no resíduo do ácido aspártico e desencadearem o processo apoptótico. As caspases são divididas em dois grupos: caspases iniciadoras (caspases 8 e 9), que têm a função de iniciar o processo apoptótico por meio da ativação de outras caspases e caspases efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7), que clivam substratos e levam às alterações celulares que ocorrem durante a apoptose (JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2010; FAVALORO *et al.*, 2012).

A apoptose ocorre, principalmente, por meio de duas vias: a extrínseca ou a intrínseca. A via extrínseca é mediada pelos receptores de morte, um subgrupo da superfamília de

receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), como TNFR e Fas (CD95) (DICKENS *et al.*, 2012). Quando ocorre a interação entre os receptores de morte presentes na membrana celular e seus ligantes específicos, como por exemplo, a ligação de Fas com seu ligante FasL (Fas ligante), um complexo sinalizador de morte no interior da célula é ativado, promovendo o recrutamento de caspase-8 e posterior ativação das caspases efetoras, desencadeando o processo de morte celular programada (ELMORE, 2007; DICKENS *et al.*, 2012).

Já a via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, está relacionada a possíveis alterações presentes na membrana externa da mitocôndria que a torna mais permeável, favorecendo a liberação de citocromo c (cyt-c) para o citoplasma celular. O cyt-c interage com o Fator Ativador de Apoptose (Apaf-1) no citosol, induzindo a formação do apoptossomo, um complexo que recruta e ativa caspase-9 que, posteriormente, ativará as caspases efetoras (FAVALORO *et al.*, 2012). A integridade da membrana mitocondrial é regulada por proteínas da família Bcl-2, as quais podem ser divididas em dois grupos: as proteínas anti-apoptóticas, responsáveis por manter a integridade desta membrana e as proteínas pró-apoptóticas, que tem a capacidade de desestruturar a conformação normal da membrana mitocondrial (BORNER, 2003).

Cada etapa da cascata apoptótica é controlada por inibidores endógenos que evitam a propagação dos sinais de morte que conduzem à concretização do processo apoptótico (STRASZEWSKI-CHAVEZ *et al.*, 2005). Dentre estes inibidores pode-se destacar as proteínas inibidoras de FLICE (FLIPs), que interferem no recrutamento e ativação da caspase-8, inibindo a apoptose via extrínseca e as proteínas anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2 e as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) que são capazes de inibir a ativação das caspases e dificultam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, impedindo a propagação dos sinais apoptóticos e a consequente morte celular (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010; HAPPO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012).

### **1.7. Apoptose na interface materno-fetal e influência de *T. gondii***

O desenvolvimento normal da placenta depende diretamente da diferenciação, adesão e invasão do trofoblasto e, na interface materno-fetal, além de participar destes mecanismos, a apoptose ainda está envolvida em processos associados à renovação celular, homeostase tecidual, transformação das artérias espiraladas, deleção de proteínas associadas à letalidade e mau desenvolvimento fetal e imunidade materna contra antígenos paternos expressos pelas células trofoblásticas (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; CROCKER *et al.*, 2003; ABRAHAMS *et al.*, 2004; SHAWN *et al.*, 2005; HEAZELL; CROCKER, 2008; RANGO, 2008; NAGAMATSU; SCHUST, 2010b).

Células apoptóticas têm sido identificadas tanto em compartimentos fetais quanto maternos da placenta, durante uma gestação normal, e a presença destas células pode estar relacionada ao estágio de desenvolvimento placentário, sendo que no terceiro trimestre gestacional a incidência de apoptose é maior do que no primeiro trimestre (LEVY; NELSON, 2000). Assim, mudanças morfológicas consistentes com a apoptose, como condensação nuclear, fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos, têm sido observadas em vilos de placentas advindas de gestações normais, demonstrando que a apoptose está associada ao remodelamento normal deste tecido (NELSON, 1996; SMITH *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2000).

Entretanto, a ocorrência anormal da apoptose em células trofoblásticas, seja por meio de seu aumento ou de sua redução, pode estar associada a complicações durante a gestação e abortos espontâneos (HUPPERTZ *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2015). Sendo assim, alterações no processo de apoptose podem comprometer o sucesso gestacional, uma vez que índices exagerados de apoptose podem levar a uma invasão superficial do trofoblasto, ocorrência de partos prematuros, casos de preeclampsia, restrição do crescimento intrauterino, abortos espontâneos e deslocamento de placenta (WHITLEY *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2012; PETSAS

*et al.*, 2012). Da mesma forma, a redução descontrolada da apoptose, com consequente invasão excessiva pelo trofoblasto no endométrio, pode contribuir para patogênese como a placenta acreta (TANTBIROJN *et al.*, 2008).

Para se manter vivo nas células hospedeiras, *T. gondii* desenvolveu alguns mecanismos capazes de controlar a resposta imune do hospedeiro, incluindo a capacidade de modular e subverter o programa apoptótico da célula hospedeira, promovendo ou inibindo a apoptose (LÜDER; GROSS, 2005; LANG *et al.*, 2007; DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2007; ANGELONI *et al.*, 2013; GUIRELLI *et al.*, 2015). Essa dupla atividade do parasito está associada com a interação dele aos sinais pró e anti-apoptóticos da célula hospedeira, bem como, com a cepa do parasito e a população celular afetada (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2007; ANGELONI *et al.*, 2009). Entretanto, estudos demonstram que *T. gondii*, geralmente, tende a inibir o processo apoptótico das células, agindo nas mesmas de forma direta ou indireta. Sendo assim, a inibição direta é restrita às células infectadas, enquanto os mecanismos indiretos de inibição da apoptose prolongam a vida tanto de células infectadas quanto de células não-infectadas pelo parasito (LÜDER; GROSS, 2005; LABBÉ; SALEH, 2008).

Os produtos parasitários são capazes de inibir a via extrínseca da apoptose, por meio da clivagem ou degradação da caspase 8 ou então, *T. gondii* interfere na via intrínseca da apoptose (VUTOVA *et al.*, 2007). Esta interferência ocorre pela modulação de mecanismos transpcionais, como a ativação de NF-κB e dos sinais transdutores e ativadores da transcrição (STAT3), ou ainda, pela interferência nos sinais pós transpcionais, como a degradação de diversas proteínas pró-apoptóticas e aumento na expressão das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (NELSON *et al.*, 2008; HWANG *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2014). O parasito também estimula a expressão das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), que atuam diretamente na degradação da caspase 3 (MOLESTINA *et al.*, 2003), e podem induzir

o bloqueio da liberação do cyt-c em todas as mitocôndrias da célula hospedeira e não apenas nas que ficam associadas ao vacúolo parasitóforo (CARMEN *et al.*, 2008; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; WU *et al.*, 2016). Além destes mecanismos, *T. gondii* é capaz de modular a fosforilação de proteínas pertencentes à subfamília das MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), como ERK1/2 (proteína quinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular), JNK (quinase N-terminal c-Jun) e P38, alterando os mecanismos de sinalização intracelular que consequentemente interferem no programa apoptótico da célula hospedeira (KATO *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2006; ANGELONI *et al.*, 2013).

### **1.8. Células BeWo e THP-1 como modelo de estudo para a toxoplasmose congênita**

O trofoblasto é responsável pela adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (FERRO, 2000). Diferencia-se em três populações celulares distintas: o citotrofoblasto, que corresponde a uma camada mononuclear em intensa proliferação, que circunda o blastocisto e auxilia no revestimento dos vilos placentários; o sinciciotrofoblasto, que é originado da fusão de células do citotrofoblasto diferenciadas, e caracteriza-se por ser uma massa celular multinucleada com grande habilidade invasiva, que permitirá a implantação do blastocisto no tecido uterino; e o trofoblasto extraviloso, que corresponde a um citotrofoblasto mononucleado diferenciado, que perdeu sua capacidade proliferativa e também adquiriu uma intensa capacidade invasiva (GUDE *et al.*, 2004, HUPPERTZ *et al.*, 2006).

Para não ser rejeitado pelo organismo materno, o trofoblasto possui mecanismos próprios que possibilitam sua sobrevivência e manutenção. Dessa forma, não expressa algumas proteínas de superfície, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, impedindo a apresentação de抗ígenos paternos ao sistema imunológico materno

(ENTRICAN, 2002) e, ainda, o citotrofoblasto é capaz de expressar moléculas de adesão e proteinases que possibilitam a fixação e invasão na mucosa uterina, além de fatores imunomoduladores importantes que permitem a tolerância materna ao feto que é semi-alogênico (NORWITZ *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado que células trofoblásticas interagem com monócitos presentes na interface materno-fetal modulando diversas atividades celulares desempenhadas por estas células do sistema imune. Estas interações são fundamentais para o sucesso gestacional e no estabelecimento de uma resposta imune adequada contra patógenos, que podem colocar em risco o desenvolvimento e a sobrevivência do feto, como o observado em infecções por *T. gondii* (FEST *et al.*, 2007; KOGA *et al.*, 2009, CASTRO *et al.*, 2013).

Para melhor entender estes mecanismos celulares, vários estudos *in vitro* são realizados utilizando como modelos experimentais linhagens celulares (células trofoblásticas BeWo e células mielomonocíticas THP-1) bem estabelecidas em cultura, as quais permitem o desenvolvimento de estudos que avaliam a interação entre monócitos e células trofoblásticas, na presença de patógenos como *T. gondii*, como modelo *in vitro* da transmissão vertical do parasito (CASTRO *et al.*, 2013).

Células trofoblásticas da linhagem BeWo foram isoladas de um coriocarcinoma humano em 1968 (PATTILLO; GEY, 1968). São capazes de formar monocamadas e crescem rapidamente em cultura. Semelhante às células trofoblásticas normais, células BeWo secretam citocinas, hormônios e expressam variados receptores de membrana comuns ao trofoblasto (FUJISAWA *et al.*, 2000). São bastante susceptíveis à infecção por *T. gondii* (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2007) e portanto, podem ser utilizadas como um bom modelo experimental em estudos que são realizados na tentativa de estabelecer o papel de células trofoblásticas na modulação do perfil imunológico durante a gestação, principalmente na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*.

Células mielomonocíticas da linhagem THP-1 foram isoladas do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Expressam receptores para fc e c3b, além dos ligantes lfa-1 e vla-4 para as moléculas icam-1 e vcam-1 respectivamente (TSUCHIYA *et al.*, 1980; PFAFF *et al.*, 2005b; BARRAGAN; HITZIGER, 2008). Podem ser mantidas em cultura por longos períodos e são permissivas ao crescimento de *T. gondii* *in vitro*, o que favorece a realização de estudos que avaliam a disseminação e a capacidade deste parasito em atravessar barreiras biológicas, como por exemplo, o ambiente transplacentário (CHANNON *et al.*, 2000; BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

O sucesso gestacional está fortemente relacionado a mecanismos celulares e imunológicos que ocorrem no organismo materno como um todo e, principalmente, na interface materno-fetal. Para que a gestação se dê de forma saudável e satisfatória, uma condição imune materna tolerogênica é requerida, entretanto, isto torna o organismo materno mais suscetível a possíveis infecções placentárias e fetais por patógenos intracelulares, como por exemplo *T. gondii*, podendo comprometer o curso normal da gestação, bem como, o desenvolvimento do feto.

Trabalhos demonstram que os monócitos são umas das principais células disseminadoras de *T. gondii* e estão presentes em grande quantidade na interface materno-fetal, concentrando-se em torno do trofoblasto. Além disso, células trofoblásticas têm a capacidade de interagir com monócitos presentes na interface materno-fetal e modular suas atividades funcionais (FEST *et al.*, 2007, CASTRO *et al.*, 2013). Por isso, estudos envolvendo linhagens de células trofoblásticas (BeWo) e monocíticas (THP-1) podem adicionar dados à complexa rede de interações que se estabelece entre estas populações celulares frente à infecção por *T. gondii*.

Um dos principais eventos associados ao sucesso gestacional, e que pode ser alterado pela infecção com *T. gondii*, refere-se aos mecanismos de morte celular das populações celulares presentes na interface materno-fetal. Assim, o tipo de morte celular e sua magnitude são fatores capazes de comprometer ou interromper a gestação. Por isso, nosso estudo teve como finalidade investigar possíveis fatores relacionados aos mecanismos de morte celular associados às interações entre células trofoblásticas e monócitos e avaliar como o protozoário *T. gondii* pode interferir nestes mecanismos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a influência de células trofoblásticas (linhagem BeWo) nos mecanismos de morte celular em monócitos humanos (células THP-1) e como *T. gondii* pode interferir nestes processos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o índice de morte celular e o índice de apoptose em células THP-1 infectadas ou não com *T. gondii*, após estímulo com sobrenadante de cultura de células BeWo infectadas ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a expressão de receptor de morte Fas/CD95 e secreção de FasL solúvel em células THP-1 infectadas ou não com *T. gondii*, após estímulo com sobrenadante de cultura de células BeWo infectadas ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a secreção de FasL solúvel, MIF e TGF-  $\beta$ 1, por células BeWo, bem como, a participação destes fatores solúveis nos índices de morte celular em células THP-1;
- Avaliar a expressão de proteínas intracelulares associadas à apoptose (caspase 3 ativa, survivina e proteínas das MAPK) em células THP-1 infectadas ou não com *T. gondii*, após estímulo com sobrenadante de cultura de células BeWo infectadas ou não com *T. gondii*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Manutenção de células BeWo e THP-1 em cultura

Células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) e células THP-1 (linhagem monocítica humana) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

Células BeWo e THP-1 foram cultivadas, separadamente, em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) contendo meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 25 mM de HEPES, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) (meio completo). As células foram incubadas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram repicadas duas vezes na semana. Células BeWo foram tratadas com tripsina contendo 0,25% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), durante 5 minutos em atmosfera úmida a 37°C e de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, adicionou-se em cada garrafa, 3 mL de meio suplementado com 10% de soro fetal bovino, para inativar a tripsina e lavar as células, as quais, após descoladas do frasco, foram transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo e distribuído em novos frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo 14 mL de meio RPMI completo, seguindo-se incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Células THP-1, por serem cultivadas em suspensão, foram retiradas das garrafas, transferidas diretamente para tubos de 15 mL, sem a necessidade de se utilizar tripsina, e

centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensos em 1 mL de meio RPMI completo e distribuído em novos frascos de cultura. O meio RPMI 1640 utilizado para a manutenção de células THP-1 foi idêntico ao utilizado em células BeWo, entretanto, o SFB foi centrifugado a 400 x g durante 10 minutos antes de ser utilizado, para evitar que componentes do soro induzissem a adesão das células à superfície do frasco.

#### **4.2. Manutenção da cepa RH de *T. gondii* em cultura**

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos em células BeWo cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino. À medida em que a maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres foi transferido para tubos de 15 mL e centrifugado a 400 x g por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo os parasitos, foi homogeneizado e distribuído em novos frascos contendo células não-infectadas.

#### **4.3. Tratamento de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo e posterior infecção com *T. gondii***

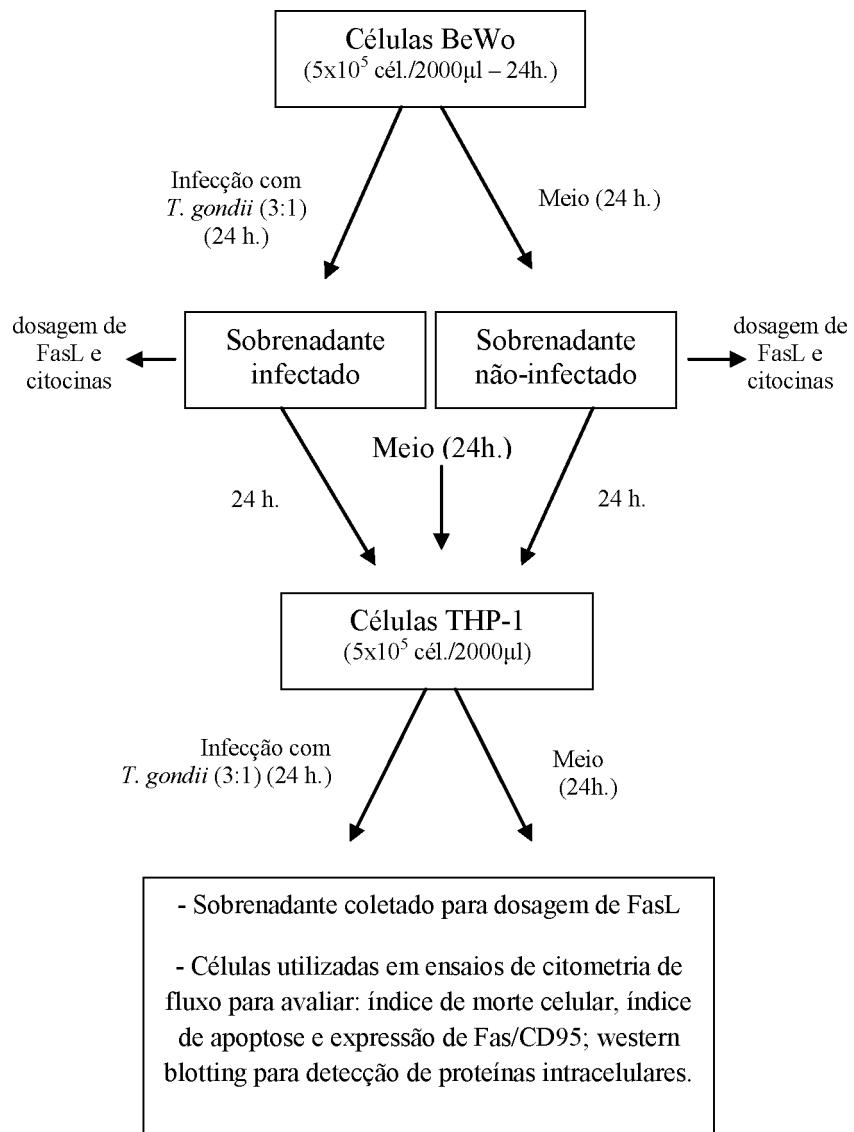
Células BeWo, coletadas a partir dos frascos de cultura, foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos e o sedimento foi ressuspensos em 1mL de meio RPMI completo. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Newbauer, e, aquelas inviáveis, foram excluídas do processo de quantificação pela coloração com o corante azul de tripan 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, células BeWo ( $5 \times 10^5$  células/2000 $\mu$ l/poço) foram adicionadas a placas de cultura de 6 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EUA) e infectadas com taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH (3 parasitos : 1 célula) (2000  $\mu$ l/poço) ou

apenas acrescidas de meio completo e cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas em condições de cultura, as placas foram centrifugadas a 400 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes de cultura, livres de células e parasitos, foram coletados, homogeneizados e armazenados em freezer a -80°C, para posterior estímulo de células THP-1 e dosagem de citocinas e Fas ligante.

Células THP-1, coletadas a partir dos frascos de cultura, foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços ( $5 \times 10^5$  células/2000μl/poço) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Posteriormente, estas células foram estimuladas com os sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de células BeWo não-infectadas ou infectadas por *T. gondii* (500μl de meio completo + 1500μl de sobrenadante de células BeWo infectadas ou não-infectadas). Como controle, células THP-1 foram acrescidas apenas de meio completo (2000μl). Após 24 horas de estímulo, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10 minutos), os sobrenadantes foram retirados e novo meio completo foi adicionado às células THP-1, por mais 24 horas. Alternativamente, células THP-1, previamente estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo, foram infectadas com a cepa RH de *T. gondii* (3 parasitos : 1 célula). Como controle, células THP-1 não estimuladas também foram infectadas com *T. gondii*. Células THP-1, infectadas ou não, foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes livres de células e parasitos foram coletados e armazenados em freezer a -80°C para posterior dosagem de Fas ligante.

Células THP-1 foram posteriormente utilizadas para citometria de fluxo (morte celular, índice de apoptose e expressão de Fas/CD95) e western blotting (detecção de proteínas intracelulares).

A cinética dos experimentos realizados neste estudo encontra-se resumida no esquemas abaixo.



#### 4.4. Índice de morte celular e índice de apoptose em células THP-1 por citometria de fluxo

O índice de morte celular e de apoptose foi determinado usando o kit de detecção de apoptose FITC/anexina V de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Brevemente, as células THP-1, cultivadas como descrito no item 4.3, foram retiradas das placas, lavadas com PBS gelado, transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. Em seguida, as células foram homogeneizadas com o

tampão de ligação 1x, a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^5$  células/100 $\mu$ L e as células transferidas para tubos de poliestireno de 15x75 mm (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Foram adicionados 5  $\mu$ L de FITC/anexina V e/ou 5  $\mu$ L da solução de marcação Iodeto de Propídio; então, as células foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Após a dupla marcação, foi adicionado o tampão de ligação 1x e a fluorescência de 20.000 células, em cada condição experimental, foi analisada por citometria de fluxo em citômetro FACSCalibur BD™ (BD Company, San Diego, CA, EUA) em, no máximo, 1 h após a marcação. Os resultados obtidos da análise pela citometria foram representados por *dot plot* e gráficos de barra. A anexina V liga-se a fosfolipídeos e possui alta afinidade por fosfatidilserina, que é externalizada na superfície de células apoptóticas, no início do processo de desorganização da membrana plasmática. O iodeto de propídeo é uma molécula que se intercala no DNA de células que já estão com a membrana celular permeável. Dessa forma, células positivas apenas para FITC/anexina V referem-se àquelas que apresentam alterações apoptóticas iniciais. Diferentemente, células duplo-positivas, ou seja, marcadas positivamente para FITC/anexina V e iodeto de referem-se àquelas que já morreram (tardiamente apoptóticas ou necróticas).

#### **4.5. Dosagem de citocinas no sobrenadante de células BeWo por ELISA**

A dosagem das citocinas em sobrenadantes de células BeWo foi realizada pelo método ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) tipo *sandwich*, de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes, para as citocinas MIF (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e TGF- $\beta$ 1 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA).

Placas de poliestireno de 96 poços de alta afinidade (Corning Incorporated, NI, EUA) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura, anti-MIF e anti-TGF- $\beta$ 1, humanos por 18 horas, à temperatura ambiente ou à 4 °C, respectivamente. Após lavagem

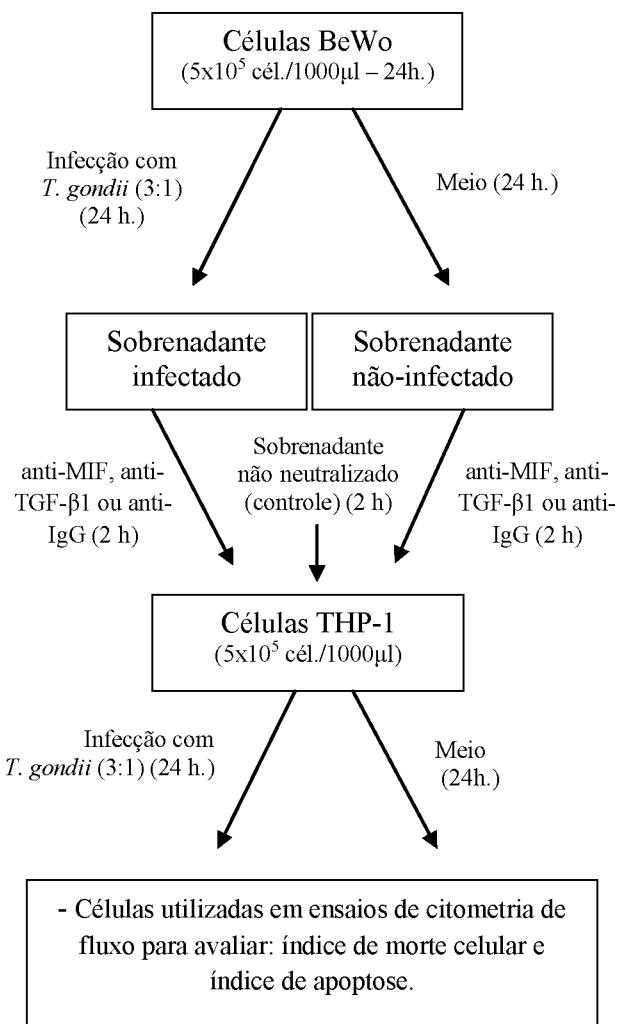
com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueio, com PBS contendo 1% de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) para MIF e soro fetal bovino para TGF- $\beta$ 1, por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados em triplicata. Para detecção de TGF- $\beta$ 1, os sobrenadantes de cultura foram pré-tratados com solução ácida de HCl 1N, e em seguida, neutralizados (NaOH 1,2M + HEPES 0,5M), para ativar a possível citocina existente no sobrenadante, uma vez que TGF- $\beta$ 1 é secretado pelas células como um complexo inativo. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas humanas recombinantes foram realizadas em diluições duplo- seriadas. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção biotinilados. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, novas lavagens foram realizadas e foi adicionado o conjugado streptavidina-peroxidase (R&D) seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagem, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]) e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de solução de ácido sulfúrico 2 N. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas, com filtro em 450 nm, e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL, de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de detecção obtido para cada análise foi 25 pg/mL (MIF) e 25 pg/mL (TGF- $\beta$ 1).

#### **4.6. Índice de morte celular e índice de apoptose em células THP-1 estimuladas com sobrenadante neutralizado de células BeWo, por citometria de fluxo**

Células BeWo foram plaqueadas ( $5 \times 10^5$  células/1000 $\mu$ l/poço) por 24 horas, infectadas com *T. gondii* (3 parasitos : 1 célula) por mais 24 horas, ou apenas acrescidas de meio

completo, nos grupos controle, e, então, tiveram seu sobrenadante coletado para estímulo de células THP-1. Dessa forma, células THP-1 foram adicionadas a placas de 6 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EUA) ( $5 \times 10^5$  células/1000 $\mu$ l/poço) e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em paralelo, sobrenadantes coletados de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii* foram tratados, separadamente, com anticorpos anti-MIF (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) ou anti-TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) humanos, em uma concentração de 10  $\mu$ g/ml, por 2 h à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, para serem neutralizados. Em seguida, células THP-1 foram estimuladas com esses sobrenadantes neutralizados (250  $\mu$ L de meio completo + 750  $\mu$ L de sobrenadante neutralizado de células BeWo) e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por mais 24 horas. Antes de serem estimuladas com os sobrenadantes neutralizados, células THP-1 receberam soro normal de cabra a 3% e ficaram em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 min, para bloqueio de receptores Fc presentes em sua superfície. Como controles, células THP-1 foram estimuladas com sobrenadante não neutralizado de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*. Também foram utilizados como controle, células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, neutralizado com anticorpo policlonal irrelevante, IgG de coelho anti-cabra (Jackson Immuno Research, USA) (10 $\mu$ g/mL). Após 24 horas de incubação, a placa contendo células THP-1 foi centrifugada (400 x g por 10 minutos) e os sobrenadantes foram descartados. Finalmente, células THP-1 foram infectadas com a cepa RH de *T. gondii* (3 parasitos : 1 célula) e, após 24 horas, à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, submetidas aos ensaios para detecção de morte celular e apoptose, descritos anteriormente no item 4.4. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

A cinética dos experimentos realizados neste estudo encontra-se resumida no esquemas abaixo.



#### 4.7. Expressão de Fas/CD95 em células THP-1 por citometria de fluxo

Células THP-1, cultivadas como descrito no item 4.3, foram retiradas das placas, lavadas com PBS gelado estéril, transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 400 x g, 4°C por 7 minutos. Em seguida, as células foram homogeneizadas em PBS com 0,5% de BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^5$  células/100 μL e as células transferidas para tubos de poliestireno de 15x75 mm (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Foram adicionados 5 μL do anticorpo monoclonal anti-CD95 conjugado com PE (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), ou 5 μL do isótipo

controle IgG de camundongo irrelevante (Milipore, São Paulo, SP, Brasil), para controle da reação. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 4 °C por 30 min ao abrigo da luz. Após a marcação, foi adicionado 1mL de PBS com 0,5% BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), em cada tudo, e os mesmos foram centrifugados por a 400 x g, por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 300 µL de fixador contendo paraformaldeído e cacodilato de sódio. Em seguida foi realizada a leitura de 20.000 células de cada condição experimental no citômetro FACSCalibur BD™ (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos da análise por citometria foram representados em histograma e gráficos de barra.

#### **4.8. Detecção de Fas ligante solúvel (FasL) em sobrenadante de cultura de células BeWo e THP-1 por ELISA**

Fas ligante solúvel foi mensurado nos sobrenadantes de célula BeWo e THP-1 utilizando o kit ELISA Fas Ligante (FasL) humano de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Brevemente, foram adicionadas à placa, já sensibilizada, 100µL da curva (de 1000 pg/mL a 1,37 pg/mL) e 100 µL das amostras de sobrenadantes de células BeWo infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* e de células THP-1 tratadas com os diferentes sobrenadantes de BeWo e posteriormente infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, e incubadas por 2,5 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, a placa foi incubada com anticorpo de detecção anti-FasL humano conjugado com biotina durante 1 hora, à temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina/peroxidase foi adicionada à placa, que permaneceu incubada por 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB e ácido sulfúrico 0,2M por 30 minutos e a DO foi mensurada em leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA).

#### **4.9. Detecção de proteínas intracelulares (survivina, ERK1/2 fosforilada, P38, JNK, caspase 3 ativa) associadas à apoptose em células THP-1 por western blotting**

Células THP-1 cultivadas como descrito no item 4.3, foram coletadas e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos, homogeneizadas e lisadas em tampão de lise gelado RIPA [50mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM de EDTA; 0,5% de Triton X100; 10% de glicerol; 1mM de dithiothreitol (DTT); 200mM de NaCl] adicionado de coquetel de inibidores de protease (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha), mais 1mM de ortovanadato de sódio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) e 1mM de fluoreto de sódio (NaF) (ambos Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Após a criólise, os lisados foram centrifugados a 15000 x g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi usado para mensuração da concentração proteica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A seguir, 100 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), sob condições desnaturantes, e transferidas para membranas de PVDF (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas contendo as proteínas totais foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante em solução de bloqueio (25mM de TRIS; 0,15M de NaCl e 0,1% de Tween 20, pH 7,4), contendo 4% de leite em pó desnaturado. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight*, à temperatura ambiente e sob agitação, com os seguintes anticorpos primários, diluídos em tampão de blotting: policlonal de coelho anti-ERK1/2 humana fosforilada (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) na concentração de 1:1000; monoclonal de camundongo anti-survivina (IAP) humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 1:500; policlonal de coelho anti-caspase-3 ativa humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 1:2500; policlonal de coelho anti-JNK humana fosforilada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 1:500; policlonal de coelho anti-P38 humana fosforilada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 1:500; ou monoclonal de camundongo anti-β-actina

humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) na concentração de 1:1000, de acordo com as instruções de cada fabricante. As membranas foram lavadas em tampão de blotting e incubadas com os respectivos anticorpos secundários, conjugados com peroxidase (anti-coelho-peroxidase ou anti-camundongo-peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA), na concentração de 1:3000 em tampão de blotting à 2% de leite em pó, durante 2 horas, à temperatura ambiente e sob agitação lenta. A reação foi analisada por meio do equipamento ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), revelada com kit de quimioluminescência (ECL kit, GE Healthcare, Campinas, SP, Brasil). Os dados foram demonstrados como densidade relativa da razão entre as intensidades médias das bandas de ERK1/2, survivina, caspase 3 ativa, P38 ou JNK e  $\beta$ -actina.

#### **4.10. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software, v. 5.0, San Diego, EUA). A comparação dos dados obtidos foi analisada por testes paramétricos, após a verificação, pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, que as variáveis exibiam distribuição normal. O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparação dos dados obtidos entre células THP-1 nas diferentes condições analisadas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) e as diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Fatores solúveis secretados por células trofoblásticas BeWo e, principalmente, infecção por *T. gondii* alteram os índices de morte celular em células THP-1

Para avaliar a influência de células BeWo e *T. gondii* na morte celular em células THP1, foram analisados os índices de morte celular e de apoptose em células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo e, posteriormente, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* (Fig. 1 e 2). Os dados referentes ao índice de morte mostraram que células THP-1 não-infectadas tiveram este índice maior quando foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo, tanto o sobrenadante de células BeWo infectadas quanto não-infectadas, quando comparadas às células THP-1 não estimuladas (controle) (Fig. 1A e B). Entretanto, não foram verificadas diferenças estatísticas significantes entre o índice de morte de células THP-1 estimuladas com o sobrenadante de células BeWo não-infectadas e células THP-1 estimuladas com o sobrenadante de células BeWo infectadas (Fig. 1A e B).

No grupo de células THP-1 infectadas, foram observadas diferenças estatísticas significantes apenas em relação à condição em que células THP-1 foram estimuladas com o sobrenadante de células BeWo infectadas. Neste caso, nesta condição, o índice de morte celular foi menor quando comparado às células THP-1 não estimuladas (controle) e às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas (Fig. 1A e B).

Ao se comparar o grupo de células THP-1 não-infectadas com o grupo de células THP-1 infectadas constatou-se que em células THP-1 infectadas o índice de morte celular foi maior do que em células THP-1 não-infectadas, em todas as condições analisadas (Fig. 1A e B).

Os resultados referentes ao índice de apoptose em células THP-1 demonstraram que células THP-1 não-infectadas, e que foram estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo, apresentaram índice de apoptose maior do que células THP-1 não estimuladas

(controle), mas entre as condições de células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas e aquelas estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, não foram verificadas diferenças estatísticas significantes (**Fig. 2A e B**).

No grupo de células THP-1 infectadas não foram constatadas diferenças estatísticas significativas entre nenhuma das condições analisadas e quando comparou-se o grupo de células THP-1 não-infectadas com o grupo de células THP-1 infectadas, verificou-se que o índice de apoptose foi menor em todas as condições em que células THP-1 foram infectadas quando comparadas às suas respectivas condições não-infectadas (**Fig. 2A e B**).

### **5.2. Infecção por *T. gondii* aumenta a secreção de MIF e diminui a secreção de TGF- $\beta$ 1 em células BeWo**

Fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) e Fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ 1 foram dosados no sobrenadante de células BeWo infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, com o objetivo de identificar se estes componentes solúveis eram secretados por células BeWo e poderiam interferir nos mecanismos de morte em células THP-1 (**Fig. 3A e B**). Verificou-se que células BeWo secretaram níveis mais elevados de MIF quando foram infectadas por *T. gondii* (**Fig. 3A**). Ao contrário, células BeWo infectadas secretaram quantidades menores da citocina reguladora TGF- $\beta$ 1 quando comparado a células BeWo não-infectadas (**Fig. 3B**).

### **5.3. MIF e TGF- $\beta$ 1 secretados por células BeWo alteram os índices de morte celular em células THP-1**

Por serem importantes citocinas presentes no sobrenadante de células BeWo, os índices de morte celular e de apoptose em células THP-1 foram analisados após estas células terem sido estimuladas com sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anti-MIF ou anti-

TGF- $\beta$ 1, para verificar a interferência destas citocinas nos mecanismos de morte em células THP-1 (**Fig 3C – F**).

Os resultados referentes ao índice de morte celular demonstraram que células THP-1 não-infectadas, e que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, neutralizados com anticorpo anti-MIF, apresentaram menor índice de morte do que células THP-1 não-infectadas e que foram estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo não neutralizados com anticorpo anti-MIF (controles) (**Fig. 3C**). Já no grupo de células THP-1 infectadas, não foram verificadas diferenças estatísticas entre células THP-1 que foram estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anti-MIF quando comparadas às células THP-1 que foram estimuladas com os sobrenadantes não neutralizados (controles) (**Fig. 3C**).

Quanto ao índice de apoptose, os resultados demonstraram que células THP-1 não-infectadas que foram estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo, neutralizados com anticorpo anti-MIF, apresentaram maior expressão de fosfatidilserina quando comparadas às células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não neutralizados (controles) (**Fig. 3D**). No grupo de células THP-1 infectadas, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anticorpo anti-MIF e aquelas estimuladas com sobrenadantes não neutralizados (controles) (**Fig. 3D**).

Em relação ao índice de morte celular em células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anti-TGF- $\beta$ 1, observou-se que células THP-1 não-infectadas apresentaram índice de morte celular menor, ao serem estimuladas com estes sobrenadantes neutralizados, em relação às células que foram estimuladas com os sobrenadantes não neutralizados com anti- TGF- $\beta$ 1 (controles) (**Fig. 3E**). De maneira oposta, em células THP-1 infectadas o índice de morte celular foi maior quando as células foram

estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anti- TGF- $\beta$ 1 comparado às células que foram estimuladas com os sobrenadantes não neutralizados (controles) (**Fig. 3E**).

Quanto ao índice de apoptose, constatou-se que células THP-1 não-infectadas expressaram mais fosfatidilserina quando foram estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anti-TGF- $\beta$ 1, em comparação às células estimuladas com os sobrenadantes não neutralizados (controles) (**Fig. 3F**). No grupo de células THP-1 infectadas, aquelas que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas, neutralizado com anti-TGF- $\beta$ 1 expressaram mais fosfatidilserina do que seu respectivo controle (células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas, não neutralizado com anti-TGF- $\beta$ 1) (**Fig. 3F**). Entretanto, células THP-1 infectadas que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, neutralizado com anti- TGF- $\beta$ 1 apresentaram menor expressão de fosfatidilserina em relação ao seu respectivo controle (células THP-1 infectadas e estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, não neutralizado com anti-TGF- $\beta$ 1) (**Fig. 3F**).

Células THP-1 infectadas ou não-infectadas e que foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo neutralizados com anticorpo irrelevante (IgG de coelho anti-cabra) não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle (células THP-1 infectadas ou não-infectadas e que foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não neutralizados) (dados não mostrados).

#### **5.4. Fatores solúveis secretados por células BeWo e infecção por *T. gondii* alteram a expressão de Fas/CD95 em células THP-1**

Com o objetivo de verificar se os índices de apoptose em células THP-1 poderiam estar relacionados à expressão de receptores de morte presentes nestas células, realizou-se a

detecção do receptor de morte Fas/CD95 em células THP-1 estimuladas ou não com os sobrenadantes de células BeWo, seguidas ou não de infecção com *T. gondii* (**Fig. 4**). No grupo de células THP-1 não-infectadas, a expressão de receptor de morte (Fas/CD95) foi maior nas condições em que células THP-1 foram estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo, tanto sobrenadante de células BeWo não-infectadas quanto sobrenadante de células BeWo infectadas com *T. gondii*, quando comparadas ao controle, correspondente às células THP-1 não estimuladas e não-infectadas (**Fig. 4A e B**). Além disso, ao se comparar a expressão de Fas/CD95 entre as condições de células THP-1 não-infectadas e estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo, não foram verificadas diferenças estatísticas significantes (**Fig. 4A e B**).

Já no grupo de células THP-1 infectadas, observou-se que células THP-1 que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas apresentaram expressão de Fas/CD95 semelhante às células controle, correspondente às células THP-1 infectadas e não estimuladas e, dessa forma, não foram verificadas diferenças estatísticas significantes (**Fig. 4A e B**). Ao contrário, células THP-1 que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas apresentaram expressão de Fas/CD95 significativamente maior do que células THP-1 infectadas e não estimuladas (controle) e células THP-1 estimuladas com o sobrenadante de células BeWo não-infectadas (**Fig. 4A e B**).

Comparando-se o grupo de células THP-1 não-infectadas com o grupo de células THP-1 infectadas, verificou-se que em todas as condições, células THP-1 infectadas expressaram mais Fas/CD95 que células THP-1 não-infectadas (**Fig. 4A e B**).

## **5.5. Infecção por *T. gondii* aumenta a secreção de Fas ligante solúvel por células THP-1**

Fas ligante solúvel foi mensurado em sobrenadante de células BeWo e THP-1 para avaliar a influência desse mediador solúvel na indução da apoptose (expressão de fosfatidilserina) em células THP-1, nas diferentes condições experimentais realizadas (**Fig. 5**). Células BeWo, independente de terem sido infectadas com *T. gondii*, secretaram níveis semelhantes de FasL, e, portanto, não foram verificadas diferenças estatísticas significantes ao se comparar células BeWo infectadas com células BeWo não-infectadas. Já em células THP-1, a secreção de FasL solúvel foi maior quando estas células foram infectadas com *T. gondii* quando comparadas àquelas que não foram infectadas (**Fig. 5A**).

Ao analisar a secreção de FasL por células THP-1 estimuladas com os diferentes sobrenadantes de BeWo e, posteriormente, infectadas ou não com *T. gondii*, verificou-se que no grupo de células THP-1 não-infectadas, não houve diferença significativa entre nenhuma das condições avaliadas, sendo assim, células THP-1 estimuladas ou não estimuladas e, independente do estímulo, secretaram quantidades semelhantes de Fas ligante solúvel (**Fig. 5B**).

No grupo de células THP-1 infectadas, novamente não foram verificadas diferenças significativas entre nenhuma das condições analisadas (**Fig. 5B**). Entretanto, ao se comparar a secreção de FasL entre as condições pertencentes ao grupo de células THP-1 não-infectadas e suas respectivas condições no grupo de células THP-1 infectadas, verificou-se que células THP-1 que foram infectadas com *T. gondii* secretaram mais FasL que células THP-1 não-infectadas (**Fig. 5B**).

## **5.6. Infecção por *T. gondii* diminui a expressão de ERK1/2 fosforilada em células THP-1**

A expressão de ERK1/2 fosforilada em células THP-1 foi analisada com o objetivo de ver a sua relação com os mecanismos de morte associados à apoptose (**Fig. 6**). No grupo de

células THP-1 não-infectadas a expressão de ERK1/2 foi semelhante nas três condições avaliadas, não havendo diferenças estatísticas significantes entre elas (**Fig. 6A**).

De maneira semelhante, no grupo de células THP-1 infectadas não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre as condições analisadas (**Fig. 6A**). Entretanto, quando comparou-se o grupo de células THP-1 não-infectadas com o grupo de células THP-1 infectadas, observou-se que a expressão de ERK1/2 fosforilada foi menor em todas as condições do grupo de células THP-1 infectadas quando comparada às mesmas condições no grupo de células THP-1 não-infectadas (**Fig. 6A**).

Os resultados referentes à expressão de ERK1/2 em células THP-1 foram representados na **Figura 6B**, que mostra as bandas específicas para ERK1/2 e β-actina.

A expressão das proteínas JNK e p38 também foi avaliada neste estudo. Entretanto, no modelo experimental proposto neste trabalho, a expressão destas proteínas não foi detectada (dados não mostrados).

### **5.7. Infecção por *T. gondii* diminui a expressão de Caspase 3 ativa em células THP-1**

A expressão de caspase 3 ativa em células THP-1 também foi analisada com o objetivo de ver a sua relação com os mecanismos de morte associados à apoptose (expressão de fosfatidilserina). No grupo de células THP-1 não-infectadas constatou-se que aquelas que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, a expressão de caspase 3 ativa foi menor quando comparadas ao controle (células THP-1 não-infectadas e não estimuladas) e às células que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas. Entre células THP-1 não estimuladas (controle) e células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas (**Fig. 7**).

No grupo de células THP-1 infectadas, verificou-se que, quando células THP-1 foram estimuladas com os diferentes sobrenadantes, a expressão de caspase 3 ativa foi menor quando comparada ao controle, referente às células THP-1 infectadas e não estimuladas e esta expressão foi ainda menor na condição em que células THP-1 foram estimuladas com o sobrenadante de células BeWo infectadas (**Fig. 7A**). Ainda, em células THP-1 infectadas e estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas a expressão de caspase 3 ativa foi menor do que em células THP-1 infectadas e estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas (**Fig. 7A**).

Ao se comparar a expressão de caspase 3 ativa entre as condições do grupo de células TPH-1 não-infectadas com as condições do grupo de células THP-1 infectadas, observou-se que, em todas as condições, células THP-1 infectadas expressaram menos caspase 3 ativa do que células THP-1 não-infectadas (**Fig. 7A**).

Os resultados referentes à expressão de caspase 3 ativa em células THP-1 foram representados na **Figura 7B**, que mostra as bandas específicas para caspase 3 ativa e  $\beta$ -actina.

A expressão da proteína survivina também foi avaliada neste estudo. Entretanto, no modelo experimental proposto neste trabalho, a expressão destas proteínas não foi detectada (dados não mostrados).

## 6. DISCUSSÃO

A gestação corresponde a um período em que o organismo materno sofre mudanças físicas e imunológicas necessárias para evitar a rejeição do feto semialogênico, que por expressar抗ígenos de histocompatibilidade paterna, pode ser reconhecido como estranho pelo sistema imune materno (ZHAO *et al.*, 2016). Durante este período, interações entre células trofoblásticas e as demais células do sistema imune materno são necessárias e determinantes para a manutenção da tolerância fetal e, consequentemente, para o sucesso gestacional (FEST *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2013; GUIRELLI *et al.*, 2015). Dessa forma, diversas populações celulares, dentre elas os monócitos, os quais são naturalmente atraídos para a interface materno-fetal, estabelecem importante interação com as células trofoblásticas, interferindo diretamente nestes mecanismos de tolerância fetal (FEST *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2013).

Mecanismos de morte celular estão comprovadamente associados ao sucesso gestacional e, dentre eles, encontra-se a apoptose, que participa tanto dos processos de tolerância fetal quanto de formação da placenta e, portanto, o seu excesso ou redução podem comprometer ou, até mesmo, impedir o desenvolvimento fetal (HUPPERTZ *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2012; PETSAS *et al.*, 2012). Assim, estudos anteriores já demonstraram que complicações gestacionais como nascimento prematuro, pre-eclâmpsia e restrição de desenvolvimento intrauterino estão associados a anormalidades no desenvolvimento e funções da placenta e que estas complicações afetam um número considerável de gestações, sendo responsáveis por significante quantidade de morbidade e mortalidade perinatal (PARDI *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2002; MCMASTER *et al.*, 2004). Como as alterações na incidência de apoptose, durante os períodos iniciais da gestação, podem alterar a morfologia e a fisiologia da placenta, o controle do processo apoptótico é determinante para o sucesso gestacional (HEAZELL; CROCKER, 2008; CHEN *et al.*, 2011).

Outro importante fator capaz de comprometer ou interromper a gestação refere-se à presença de microorganismos na interface materno-fetal. *T. gondii* é um desses patógenos que ao se disseminar pelo organismo materno, pode atravessar a barreira placentária e ser transmitido verticalmente para o feto, comprometendo o seu desenvolvimento normal ou, até mesmo, sua sobrevivência (LANG *et al.*, 2007; KODJIKIAN, 2010). Além disso, a infecção por *T. gondii* altera o estado de tolerância fetal, uma vez que esta condição é mantida, principalmente, por um perfil de resposta imune do tipo anti-inflamatória e a defesa contra *T. gondii* requer uma resposta imune do tipo pró-inflamatória (LUPPI, 2003; LOPES *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2015). Ainda, *T. gondii* é capaz de alterar o programa apoptótico tanto da célula hospedeira quanto das células vizinhas, colocando em risco o sucesso gestacional (LANG *et al.*, 2007; DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2007; LÜDER; GROSS, 2005; ANGELONI *et al.*, 2013; GUIRELLI *et al.*, 2015).

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar como células trofoblásticas (BeWo) podem interagir com células monocíticas humanas (THP-1) e alterar os mecanismos de morte nesta população celular, como índice de apoptose e expressão de receptores de morte, bem como, de proteínas intracelulares associadas a possíveis vias de sinalização envolvidas nos processos de apoptose. Além disso, estes mecanismos de morte em células THP-1 também foram avaliados após a infecção por *T. gondii*, com o intuito de analisar como este parasita pode interferir e modular estes processos.

Os resultados referentes à morte celular demonstraram que células THP-1 apresentaram índice de morte mais elevado quando foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo, independente destas células trofoblásticas terem sido infectadas com *T. gondii* ou não. Isto indica que células trofoblásticas, provavelmente, secretam fatores solúveis que induzem este aumento de morte em células THP-1 e que a infecção destas células trofoblásticas por *T. gondii* não interfere diretamente na capacidade modulatória que elas exercem sobre os

monócitos. Entretanto, em células THP-1 infectadas, apenas aquelas que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas apresentaram alteração no índice de morte celular, e isto possivelmente está associado aos fatores que são produzidos e secretados por células BeWo em decorrência da infecção por *T. gondii*. Este resultado sugere que os componentes solúveis presentes em um determinado microambiente interferem diretamente nos fenômenos celulares que ocorrem nas células presentes neste microambiente.

Como a apoptose é um dos principais mecanismos de morte celular, importante tanto na manutenção da gestação (HUPPERTZ *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2012; PETSAS *et al.*, 2012) quanto na defesa contra patógenos intracelulares, como *T. gondii* (VAUX *et al.*, 1994; LÜDER *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2012), neste trabalho investigamos se células BeWo e/ou a infecção por *T. gondii* poderiam interferir neste mecanismo. Para isso, avaliou-se a expressão de fosfatidilserina em células THP-1, uma vez que a exposição deste fosfolipídio no lado externo da membrana celular é uma das consequências da ativação do processo apoptótico, e, portanto, a exposição de fosfatidilserina é considerada um sinal precoce da morte celular programada (HUPPERTZ *et al.*, 2006). Entretanto, exposição de fosfatidilserina pode ser reversível e a cascata apoptótica pode ser evitada ou interrompida prevenindo a morte celular (MARTIN *et al.*, 1996; NAITO *et al.*, 1997). Dessa forma, os dados apresentados neste trabalho referentes ao índice de apoptose foram determinados com base nas alterações apoptóticas precoces, decorrentes da exposição de fosfatidilserina.

Os resultados obtidos revelaram que em células THP-1 não-infectadas, o índice de apoptose foi maior quando elas foram estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo, e que este fenômeno foi independente da presença de *T. gondii* em células BeWo. Isto sugere que células BeWo secretam fatores solúveis que são capazes de induzir apoptose em células THP-1 e que estes fatores não estão relacionados com a presença de *T. gondii* nestas células. Assim, este pode ser um mecanismo de auto-proteção desenvolvido pelo próprio trofoblasto,

para evadir de uma possível resposta imune desempenhada pelos monócitos, os quais poderiam reconhecê-lo como estranho para o organismo materno e reagirem contra ele, comprometendo a manutenção da gestação. Similar a esta hipótese, estudos anteriores demonstraram que células trofoblásticas modulam, direta ou indiretamente, o perfil tolerogênico necessário durante a gestação e que, dessa forma, durante uma gestação normal, o trofoblasto desenvolve mecanismos imunes que tornam a interface materno-fetal um microambiente imunologicamente privilegiado, favorecendo o seu desenvolvimento (LEVY; NELSON, 2000; ABRAHAMS *et al.*, 2004; CHAOUAT *et al.*, 2010; SALAMONE *et al.*, 2012). Ações desse tipo já foram comprovadas em trabalhos que demonstraram que o trofoblasto é capaz de induzir a morte de células imunes vizinhas que poderiam ser sensíveis aos aloantígenos paternos presentes nele, rejeitando-o (RAJASHEKHAR *et al.*, 2003; ABRAHAMS *et al.*, 2004; STRASZEWSKI-CHAVEZ *et al.*, 2005; CHAOUAT *et al.*, 2010; SALAMONE *et al.*, 2012).

Em células THP-1 não-infectadas o índice de apoptose foi semelhante àquele observado quanto ao índice de morte celular, ou seja, células BeWo induziram aumento de morte celular e de apoptose em células THP-1, sugerindo que a apoptose seja o mecanismo de morte predominante nestas condições. Isto contribui para que a interface materno-fetal seja um microambiente imunologicamente privilegiado e menos inflamatório, uma vez que na apoptose, as células morrem sem que haja ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular evitando o acionamento de uma resposta imune exacerbada e danosa às células vizinhas (STRASSER *et al.*, 2011; HAPPO *et al.*, 2012). Quando esta morte ocorre por outro mecanismo, como na necrose, ocorre a lise celular que resulta em uma resposta inflamatória potencialmente danosa, que poderia comprometer o sucesso gestacional (CURTIN *et al.*, 2002; SINAI *et al.*, 2004).

Diferente do que foi observado no grupo de células THP-1 não-infectadas, quando células THP-1 foram infectadas por *T. gondii*, os sobrenadantes de células BeWo não alteraram o índice de apoptose em nenhuma das condições avaliadas, sugerindo que os fatores solúveis secretados por células BeWo, infectadas ou não, não interferem diretamente na modulação da apoptose em células THP-1, quando elas são infectadas por *T. gondii*, e que a modulação deste mecanismo, provavelmente, está associada ao parasito.

Ao se comparar o índice de apoptose entre o grupo de células THP-1 não-infectadas e o grupo de células THP-1 infectadas, constatou-se que em todas as condições, este índice foi menor em células THP-1 infectadas, sugerindo, portanto, que este é um fenômeno manipulado pelo parasito. Estudos anteriores já demonstraram que, como uma estratégia de sobrevivência, *T. gondii* desenvolveu habilidades que bloqueiam a apoptose da célula hospedeira, por meio de diversos mecanismos, facilitando sua evasão do sistema imune do hospedeiro e sua consequente disseminação para os demais tecidos do organismo (HIPPE *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2012; ANGELONI *et al.*, 2013). Além disso, quando *T. gondii* bloqueia a apoptose, o tempo de viabilidade da célula hospedeira aumenta, e assim, o parasito garante a obtenção de metabólitos necessários à sua sobrevivência, mantendo-se vivo por mais tempo (DENKERS, 2003). Como consequência disto, pode-se estabelecer a fase crônica da infecção, propiciando maior possibilidade de sucesso do parasitismo (HEUSSLER *et al.*, 2001). É importante ressaltar que a capacidade que *T. gondii* possui de bloquear a apoptose, está diretamente associada à cepa do parasito. Sendo assim, outros trabalhos já demonstraram que cepas mais virulentas, como a cepa RH, possuem capacidade de inibir apoptose em células trofoblásticas, enquanto que cepas menos virulentas, como a ME49, não são capazes de bloquear este mecanismo (ANGELONI *et al.*, 2009; GUIRELLI *et al.*, 2015).

Interessantemente, apesar do índice de apoptose ser menor em células THP-1 infectadas do que células THP-1 não-infectadas, elas apresentaram maior índice de morte celular,

sugerindo que esta morte ocorre predominantemente por meio de outros tipos de morte celular, como por exemplo, por necrose. Sabe-se que para se disseminar, *T. gondii* multiplica-se na célula hospedeira até que ela se rompa e ele possa invadir outras células (DUBEY, 1998; PENG *et al.*, 2011; ARAUJO *et al.*, 2015). Portanto, o maior índice de morte em células THP-1 pode ser apenas uma consequência natural da infecção e um mecanismo de disseminação parasitária. Ao contrário, a apoptose é uma mecanismo de defesa que limita a multiplicação e a disseminação de patógenos intracelulares (RODRIGUES *et al.*, 2012). Isto porque durante a apoptose, as células se modificam morfológicamente e liberam sinais que as tornam facilmente detectadas por células fagocíticas que irão removê-las e digeri-las, impedindo a sobrevivência e disseminação destes microrganismos (STRASSER *et al.*, 2011, HAPPO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2015).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que pode existir uma interação entre diferentes tipos de morte celular e, consequentemente, um mecanismo de morte pode induzir outro e vice-versa (FINK; COOKSON, 2005; NIKOLETOPOULON *et al.*, 2013). Dessa forma, quando as células entram em apoptose, sofrem as alterações morfológicas, formam os corpos apoptóticos, mas mesmo assim, não são fagocitadas pelas células fagocíticas, estes corpos apoptóticos entram em um processo de morte conhecido como necrose secundária (FINK; COOKSON, 2005). Assim, as próprias células THP-1 infectadas que expressaram fosfatidilserina podem ter estimulado outros mecanismos de morte, contribuindo com o aumento do índice de morte celular.

Os resultados aqui apresentados mostraram que MIF e TGF- $\beta$ 1 foram citocinas secretadas por células BeWo infectadas ou não-infectadas por *T. gondii*, assim como demonstrado, e bem descrito, em trabalhos anteriores, que utilizaram esta mesma linhagem celular (ANGELONI *et al.*, 2009; ANGELONI *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2013). Ambas citocinas assumem papel essencial durante a gestação, participando, por exemplo, dos

processos de tolerância fetal (TGF- $\beta$ 1) (JONES *et al.*, 2006), na defesa do organismo contra microrganismos intracelulares, como *T. gondii* (MIF) (GOMES *et al.*, 2011) e ainda podem estar associadas a variações nos mecanismos de morte celular (TGF- $\beta$ 1 e MIF) (ANGELONI *et al.*, 2009; ANGELONI *et al.*, 2013).

Com o objetivo de elucidar alguns componentes solúveis secretados por células BeWo e que poderiam estar envolvidos na modulação da morte celular em células THP-1, as citocinas MIF e TGF- $\beta$ 1 foram, separadamente, neutralizadas nos sobrenadantes de BeWo, e posteriormente, células THP-1 foram estimuladas com estes sobrenadantes e infectadas ou não com *T. gondii*. Nossos resultados mostraram que tanto MIF quanto TGF- $\beta$ 1 secretados por células BeWo, influenciaram na morte celular em células THP-1.

Em células THP-1 não-infectadas, a neutralização de MIF nos sobrenadantes de células BeWo levou à um menor índice de morte celular, contudo, maior índice de apoptose. Estes dados sugerem que, neste caso, MIF secretado por células BeWo age como um fator solúvel indutor de morte celular, apesar de inibir a apoptose. Assim, MIF induz a morte de células THP-1 não-infectadas por meio de mecanismos não-apoptóticos, como por exemplo, a necrose. De acordo com isto, estudos realizados em células deciduais de camundongos, também demonstraram atividade anti-apoptótica desempenhada por MIF (COSTA *et al.*, 2016), bem como, em células-tronco mesenquimais de ratos (XIA *et al.*, 2015). Entretanto, em células THP-1 submetidas à infecção por *T. gondii*, a ausência de MIF no sobrenadante de células BeWo, não alterou nem índice de morte celular, e nem o índice de apoptose em células THP-1. Isto sugere que, MIF secretado por células BeWo, não age diretamente nos mecanismos de morte celular, quando células THP-1 estão infectadas com *T. gondii*, o que pode ser uma consequência da própria manipulação celular exercida pelo parasito.

Quando a citocina neutralizada no sobrenadante de células BeWo foi TGF- $\beta$ 1, os resultados demonstraram, novamente, que em células THP-1 não-infectadas, a ausência desta

citocina reduziu no índice de morte celular, mas aumento o índice de apoptose. Estes dados sugerem que TGF- $\beta$ 1, secretado por células BeWo, assume papel importante na indução de morte celular em células THP-1 não-infectadas, mas esta morte não ocorre por meio da apoptose, uma vez que, TGF- $\beta$ 1 agiu como uma molécula anti-apoptótica, neste grupo celular. Trabalhos anteriores demonstraram resultados semelhantes em células trofoblásticas e, assim, células de linhagem BeWo apresentaram índice de apoptose reduzido ao serem tratadas com TGF- $\beta$ 1 (ANGELONI *et al.*, 2013).

Em células THP-1 infectadas, a ausência de TGF- $\beta$ 1, no sobrenadante de células BeWo, induziu aumento do índice de morte celular, mostrando que TGF- $\beta$ 1, secretado por células BeWo, assume papel importante na indução de morte celular em células THP-1 infectadas. Entretanto, o índice de apoptose foi maior ou menor, dependendo do tipo de sobrenadante analisado. Sendo assim, quando células THP-1 infectadas foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas e neutralizado com anti-TGF- $\beta$ 1, o índice de apoptose foi maior, indicando uma atividade anti-apoptótica da citocina. Ao contrário, quando células THP-1 infectadas foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas e neutralizado com anti-TGF- $\beta$ 1, o fenômeno observado foi o oposto, ou seja, a ausência desta citocina diminuiu o índice de apoptose em células THP-1 infectadas, indicando uma ação pró-apoptótica de TGF- $\beta$ 1. Estudos já demonstraram que TGF- $\beta$ 1 tem a capacidade de induzir ou bloquear a morte celular por apoptose e esta dupla atividade está relacionada com a indução da expressão do receptor de morte Fas/CD95, o tipo celular analisado e o microambiente em que essas células se encontram (D'ANGELILLO *et al.*, 2011; BAI *et al.*, 2011).

O sistema Fas/FasL representa um dos importantes fatores ativadores da via apoptótica (NAGATA, 1994; HIPPE *et al.*, 2008). Por isso, tanto a expressão do receptor de morte (Fas/CD95) em células THP-1, quanto a secreção de seu respectivo ligante (FasL) por células

BeWo e THP-1 foram avaliados neste estudo. Os resultados referentes à expressão de Fas/CD95 demonstraram que células THP-1 não-infectadas expressaram mais receptor de morte quando foram estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo, sugerindo que células trofoblásticas, independente de estarem infectadas, secretam componentes que induzem a expressão de Fas/CD95 em células THP-1. Estes dados reforçam aqueles obtidos quanto aos índices morte celular e de apoptose, sugerindo que células BeWo estimulam o aumento da expressão de Fas/CD95 em células THP-1 não-infectadas e que este receptor ao ser ativado por seu ligante (FasL) inicia o processo apoptótico por meio da via extrínseca, levando à expressão de fosfatidilserina seguida das demais modificações celulares que resultarão na morte celular. Juntos, estes resultados sugerem que esta seja uma ação das células trofoblásticas na tentativa de se protegerem de uma possível resposta imune que poderia ser dirigida contra o feto, colocando em risco o seu desenvolvimento.

No grupo de células THP-1 infectadas, apenas células tratadas com sobrendante de células BeWo infectadas apresentaram maior expressão de Fas/CD95, o que provavelmente está relacionado aos componentes presente neste sobrenadante, uma vez que a composição do microambiente é determinante para a maior ou menor expressão de receptor de morte, como demonstrado em trabalhos anteriores (BAI *et al.*, 2011; ANGELONI *et al.*, 2013).

Finalizando a análise referente à expressão de Fas/CD95 em células THP-1, foi possível constatar que células THP-1 infectadas expressaram mais receptor de morte do que células THP-1 não-infectadas, em todas as condições analisadas, indicando que este aumento ocorre devido à infecção por *T. gondii*. Contudo, apesar de células THP-1 infectadas terem expressado mais Fas/CD95, a expressão de fosfatidilserina foi menor neste grupo quando comparada às células THP-1 não-infectadas. Estes resultados sugerem que este aumento na expressão de receptor de morte pode ser uma estratégia desenvolvida pela própria célula parasitada, para que assim, ela possa entrar em apoptose e eliminar o parasito, controlando a

disseminação do mesmo. Semelhante a isto, estudos demonstraram que a apoptose pode ser modulada pela própria célula hospedeira, limitando a multiplicação e disseminação de patógenos intracelulares como *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* spp. e *T. gondii* (RODRIGUES *et al.*, 2012). Em contrapartida, mesmo que a célula hospedeira expresse mais Fas/CD95, o parasito ativa outros mecanismos intracelulares que impedem que estes sinais apoptóticos se propaguem e levem a célula a morrer por apoptose, como demonstrado em outros estudos (ANGELONI *et al.* 2013; CAI *et al.*, 2014).

Outros trabalhos do nosso grupo apresentaram resultados diferentes em células trofoblásticas. Nestes trabalhos, células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e células trofoblásticas extravilosas humanas (linhagem HTR-8/SVneo) infectadas com *T. gondii* expressaram menos Fas/CD95 e menos fosfatidilserina, sugerindo que nestas células, *T. gondii* é capaz de controlar a apoptose por meio da interferência no receptor de morte (ANGELONI *et al.*, 2013; GUIRELLI *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível inferir que a ocorrência da apoptose e de mecanismos que levam a este processo de morte celular é dependente da população celular avaliada e das funções principais que são desempenhadas por estas células. Como os monócitos são células imunes envolvidas na defesa contra patógenos, nossos dados indicam que estas células podem expressar mais receptor de morte para controlar a disseminação de *T. gondii*, mas, por outro lado, o parasito reverte esta situação para se manter vivo e apto a infectar outras células. Entretanto, como as células trofoblásticas não são especializadas para defesa, podem ser mais vulneráveis à ação do parasito, que impede, inclusive, a expressão do receptor de morte nas células hospedeiras.

A secreção de FasL foi mensurada tanto no sobrenadante de células BeWo quanto THP-1, ambas infectadas ou não-infectadas por *T. gondii*. Isto porque tanto células trofoblásticas, quanto monócitos, armazenam este componente intracelularmente e, mediante ativação celular, ele pode ser liberado e se ligar ao seu receptor de morte (Fas/CD95) induzindo o

processo de morte celular por apoptose (MAYHEW, 2001; STRASZEWSKI-CHAVEZ *et al.*, 2005). Dessa forma, os resultados referentes à secreção de FasL mostraram que a infecção por *T. gondii* em células THP-1 aumentou a secreção deste componente por estas células, mas não em células BeWo, que secretaram quantidades semelhantes de FasL, independente da infecção. Além disso, os sobrenadantes de células BeWo infectadas ou não-infectadas, não alteraram significativamente a secreção de FasL por células THP-1, sugerindo que os componentes solúveis secretados pelo trofoblasto não modulam as atividades dos monócitos por meio da secreção de FasL. Entretanto, a infecção por *T. gondii* exerce esta função moduladora nos monócitos, uma vez que células THP-1 infectadas, secretaram mais FasL do que células THP-1 não-infectadas, independente de terem sido estimuladas com sobrenadante de células BeWo.

Como a apoptose pode ser modulada pela própria célula hospedeira para conter a disseminação de patógenos intracelulares (RODRIGUES *et al.*, 2012), estes resultados sugerem que células THP-1 infectadas secretam mais FasL para que este componente solúvel se ligue aos seus respectivos receptores de morte, também presentes e mais expressos nas células infectadas. Assim, esta ligação de FasL ao seu receptor Fas/CD95 ativa a via apoptótica que pode resultar na morte da célula hospedeira com consequente contenção do parasitismo. No entanto, apesar de expressarem mais Fas/CD95 e secretarem mais FasL, células THP-1 infectadas apresentaram menor índice de apoptose, sugerindo a interferência de *T. gondii* na inibição desta via apoptótica.

Por outro lado, a maior secreção de FasL por células THP-1 infectadas pode ser uma estratégia desenvolvida e desencadeada pelo parasito e não pela célula parasitada. Neste caso, *T. gondii* estimula maior secreção de FasL por células THP-1 com o objetivo de induzir a morte de células imunes vizinhas que expressam Fas/CD95 e que poderiam agir contra as células infectadas, comprometendo a sobrevivência e disseminação de *T. gondii*. De acordo

com estes dados, estudos já demonstraram que a secreção de FasL por células trofoblásticas induz a apoptose em células imunes vizinhas, como linfócitos T, que expressam Fas/CD95 em suas membranas, e, desta forma, esta secreção de FasL age como um mecanismo de evasão, empregado por algumas populações celulares, para escaparem do sistema imune (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; RAJASHEKHAR *et al.*, 2003; ABRAHAMS *et al.*, 2004; SHAWN *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que a regulação da apoptose é modulada pela fosforilação de diferentes proteínas quinases, dentre elas, ERK, JNK e P38, que representam os maiores subtipos pertencentes à família das MAPK (KATO *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2012, WANG *et al.*, 2017). Dessa forma, este trabalho também avaliou a fosforilação destas três proteínas com o objetivo de avaliar a participação delas na modulação da apoptose em células THP-1. A fosforilação de JNK e P38 não foi verificada no modelo experimental utilizado, mas várias investigações indicam que elas são capazes de ativar processos associados à ocorrência de apoptose (IP; DAVIS, 1998; KYRIAKIS, AVRUCH, 2001; CAI *et al.*, 2006). Quanto à expressão de ERK1/2 fosforilada, os resultados mostraram que células BeWo, em todas as condições analisadas, não foram capazes de modular a fosforilação desta proteína em células THP-1. Entretanto, células infectadas com *T. gondii* apresentaram menor expressão de ERK1/2 fosforilada do que células THP-1 não-infectadas, independente da condição avaliada, indicando que a presença do parasita modula negativamente a fosforilação desta proteína.

Estudos realizados em células trofoblásticas (linhagem BeWo), demonstraram resultados diferentes, em que *T. gondii* induziu maior fosforilação de ERK1/2 do que células não-infectadas e isto esteve associado ao menor índice de apoptose em células infectadas, sugerindo uma atividade anti-apoptótica de ERK1/2 (ANGELONI *et al.*, 2013). Outro trabalho envolvendo células tumorais de colo uterino humano (SW620) também

demonstraram uma ação anti-apoptótica de ERK1/2, uma vez que o tratamento destas células com o inibidor de ERK1/2 induziu aumento de caspase 3 e caspase 9, duas caspases ativadoras da apoptose (CHEN *et al.*, 2016). De acordo com estes estudos, poderíamos sugerir que a diminuição da expressão de ERK1/2 em células THP-1 infectadas com *T. gondii* é um mecanismo ativado pela própria célula na tentativa de induzir a apoptose e controlar o parasitismo. Entretanto, no nosso modelo experimental, ERK1/2 fosforilada não parece agir como uma molécula anti-apoptótica, ou então, *T. gondii* reverte este mecanismo, uma vez que a fosfatidilserina também foi menos expressa nas condições de infecção.

Estudos realizados em neutrófilos humanos mostraram que a inibição de ERK1/2 diminuiu a apoptose em casos de infecção com *Entamoeba histolytica* (SIM *et al.*, 2005) e em linhagens celulares de fibroblasto humano e murino, a apoptose induzida por estresse oxidativo também esteve associada à ativação de ERK1/2, sendo que a inibição desta proteína culminou na redução da apoptose (LEE *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2009), sugerindo uma atividade pró-apoptótica desta proteína. No nosso trabalho, células THP-1 infectadas expressaram menos ERK1/2 fosforilada, o que coincidiu com os resultados referentes à expressão de fosfatidilserina. Sendo assim, no modelo experimental proposto neste estudo, sugere-se que a proteína ERK1/2 fosforilada exerce atividade pró-apoptótica, e que *T. gondii* inibe sua fosforilação como uma estratégia de defesa para se manter vivo dentro da célula e apto a se disseminar pelos demais tecidos do organismo.

Outras duas proteínas intracelulares associadas aos mecanismos de apoptose também foram avaliadas neste trabalho: survivina (proteína pertencente à família das IAPs) e caspase 3 (caspase efetora da apoptose). Estudos anteriores demonstraram que survivina é expressa em células trofoblásticas e que a infecção por *T. gondii* não altera sua expressão (ANGELONI *et al.*, 2013). Por outro lado, em fibroblastos humanos, a inibição da apoptose esteve relacionada à maior expressão das IAPs (BLADER *et al.*, 2001; MOLESTINA *et al.*, 2003).

De acordo com nossos resultados, a expressão de survivina não foi verificada em nenhuma das condições analisadas, sendo assim, sugere-se que esta proteína não está associada aos mecanismos apoptóticos em células THP-1.

Quanto à expressão de caspase 3 ativa, os dados obtidos neste trabalho mostraram que células BeWo, principalmente aquelas que foram infectadas, induziram menor expressão de caspase 3 ativa em células THP-1, sugerindo que os fatores solúveis secretados pelas células trofoblásticas modulam a expressão desta proteína em monócitos. Além disso, em células THP-1 infectadas com *T. gondii*, independente de terem sido estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo, a expressão de caspase 3 ativa foi menor quando comparada às células não-infectadas, indicando que a infecção por *T. gondii* bloqueia a ação de caspase 3. Como esta molécula representa uma das principais caspases executoras da morte celular por apoptose (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998), sugere-se fortemente que *T. gondii* bloqueia sua ação como uma forma de impedir a morte da célula hospedeira e, consequentemente, garantir a sua sobrevivência no interior desta célula.

Comprovando esta hipótese, alguns estudos demonstraram que *T. gondii* induz o bloqueio da apoptose por meio da inibição da ativação de caspase 3. Assim, Goebel e colaboradores (2001) mostraram que o índice de apoptose foi menor em células HL-60 (célula de leucemia promielocítica humana) e U937 (células de linfoma histiocítico humano) infectadas com *T. gondii* do que em células não-infectadas e isto esteve associado à menor ativação caspase 3 nas células infectadas; bem como Payne e colaboradores (2003), que obtiveram resultados semelhantes em fibroblastos murinos. Baseado nestas evidências, ao se comparar os resultados de expressão de caspase 3 ativa em células THP-1 com aqueles referentes ao índice de apoptose, verifica-se que ambos foram menos expressos nas condições em que células THP-1 foram infectadas com *T. gondii*, sugerindo que o parasito bloqueia a

apoptose em células THP-1 por meio da interferência na cascata de sinalização dependente de caspase 3.

Interessantemente, estudos realizados em fibroblastos humanos indicaram uma associação entre a expressão de ERK1/2 fosforilada, ativação de caspase 3 e índice de apoptose. Dessa forma, Shin e colaboradores (2009) demonstraram que as células morreram por apoptose após a ativação de caspase 3, que ocorreu mediante ativação de ERK1/2. Nossos resultados também mostram esta associação, uma vez que células THP-1 infectadas apresentaram menor índice de apoptose, menos ERK1/2 e menos caspase 3 ativa, sugerindo que em células THP-1, este mecanismo apresentado por Shin e colaboradores também ocorra. Assim, *T. gondii* inibe a ativação de ERK1/2, que consequentemente inibirá a ativação de caspase 3, bloqueando a apoptose.

Juntos, os resultados apresentados neste trabalho reforçam a importância de se estudar as interações que ocorrem entre as populações celulares presentes na interface materno-fetal, já que os fatores solúveis secretados por elas podem alterar a composição deste microambiente e interferir nas atividades funcionais de células imunes que se encontram neste sítio (NAGAMATSU, 2010). Além disso, nossos resultados mostraram que células trofoblásticas e, principalmente, *T. gondii* são capazes de modular os mecanismos de morte celular em células THP-1, sugerindo que fenômenos similares possam ocorrer *in vivo* e, dessa forma, estas interações entre estas células e entre parasito-hospedeiro podem interferir e até mesmo, comprometer, o sucesso gestacional.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos nossos resultados podemos concluir que:

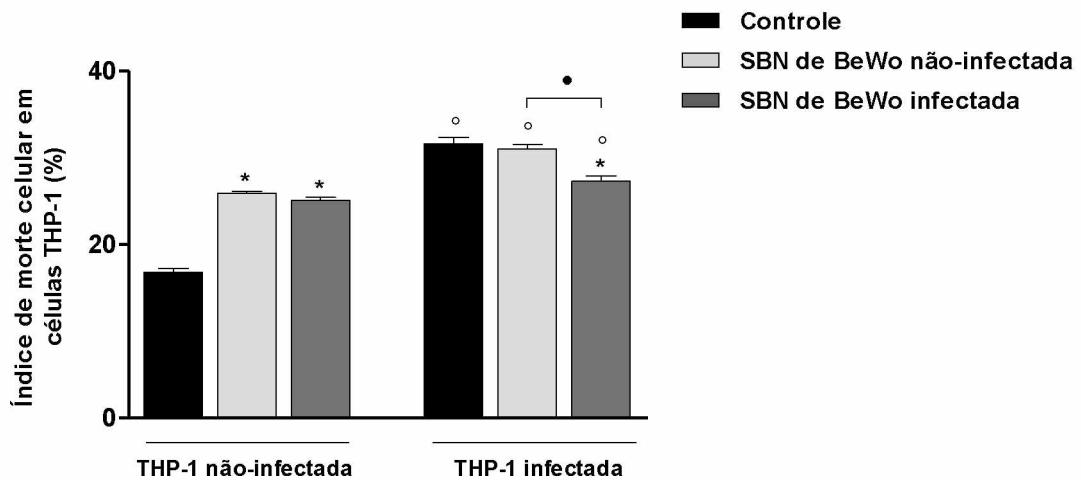
- Fatores solúveis, secretados por células trofoblásticas BeWo, induzem morte celular e apoptose em células THP-1 não-infectadas com *T. gondii*;
- Células THP-1 infectadas com *T. gondii* apresentam maior índice de morte celular e menor índice de apoptose do que células THP-1 não-infectadas, provavelmente, como uma forma de disseminação e evasão do sistema imune, desenvolvida pelo parasito;
- MIF e TGF- $\beta$ 1, secretados por células BeWo, induzem morte celular e inibem apoptose em células THP-1 não-infectadas com *T. gondii*;
- TGF- $\beta$ 1, secretado por células BeWo, inibe apoptose em células THP-1 infectadas com *T. gondii*;
- TGF- $\beta$ 1, secretado por células BeWo não-infectadas, inibe apoptose em células THP-1 infectadas com *T. gondii*, enquanto que, TGF- $\beta$ 1, secretado por células BeWo infectadas, induz apoptose em células THP-1 infectadas com *T. gondii*;
- Fatores solúveis, secretados por células BeWo, induzem maior expressão de Fas/CD95 em células THP-1 não-infectadas;
- Infecção por *T. gondii* induz maior expressão de Fas/CD95 em células THP-1;
- Infecção por *T. gondii* induz secreção de FasL por células THP-1;
- Infecção por *T. gondii* diminui a ativação de ERK1/2 em células THP-1;
- Fatores solúveis, secretados por células BeWo, modulam a ativação de caspase 3 em células THP-1;
- Infecção por *T. gondii* diminui a expressão de caspase 3 ativa em células THP-1.

## **8. FIGURAS**

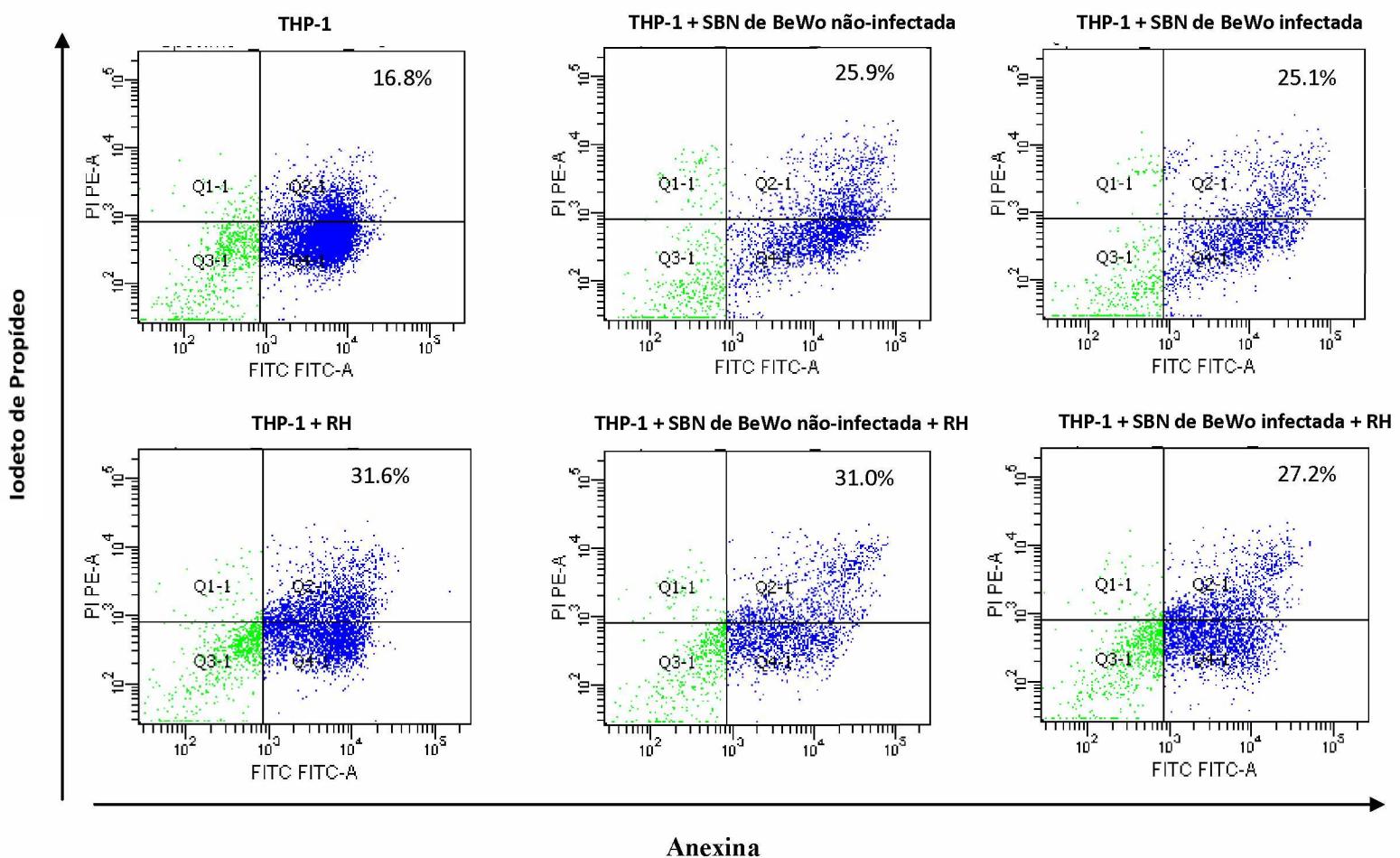
**Figura 1:** Influência de células trofoblásticas BeWo e *T. gondii* no índice de morte celular (%) em células THP-1. Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes (SBN) de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, por 24 horas e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram tratadas apenas com meio de cultura. A reação foi realizada utilizando-se o kit Anexin V e analisadas por citometria de fluxo. As células duplamente marcadas (anexina e iodeto de propídeo) representaram a população de células mortas. **(A)** Análise quantitativa (%) do índice de morte celular em células THP-1. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* após estímulo com os diferentes sobrenadantes de células BeWo e os respectivos controles; (●) Diferenças estatísticas entre células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas e aquelas estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, seguidas ou não de infecção por *T. gondii*; (°) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas e células THP-1 não infectadas. **(B)** Gráficos representativos em *dot spots* obtidos da análise por citometria de fluxo, sendo Q2-1 as células duplo-marcadas (valor médio representado dentro dos parênteses).

**Figura 1**

**A**



**B**

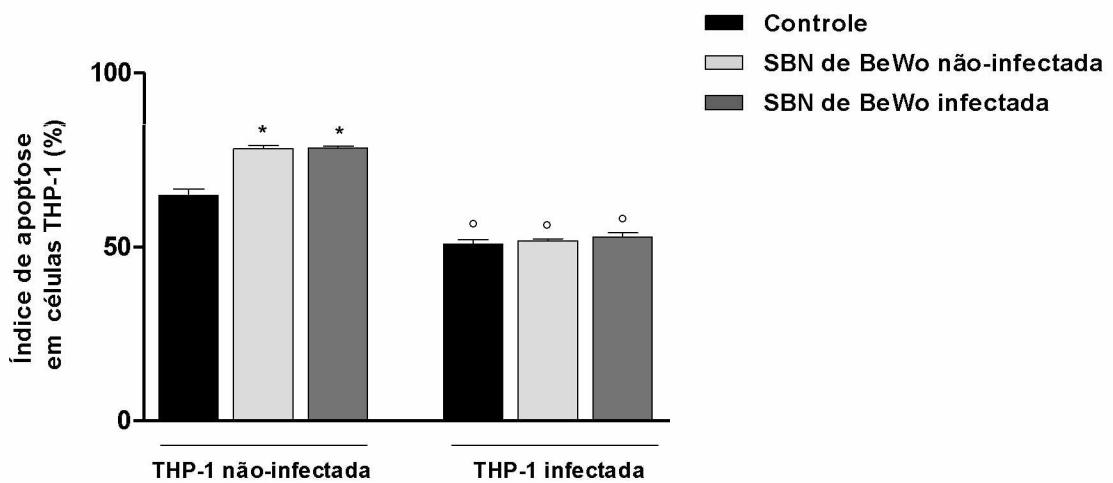


**Anexina**

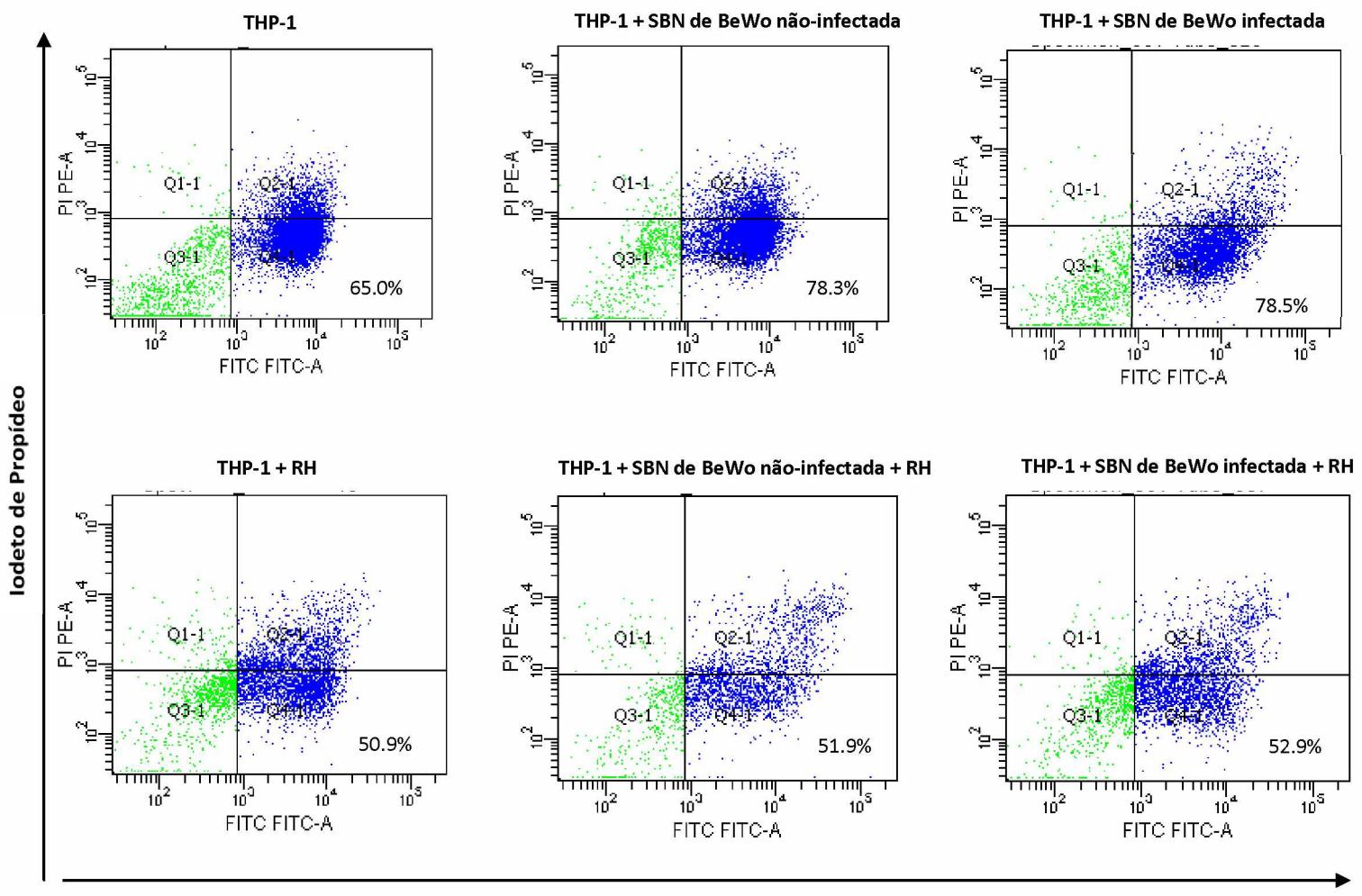
**Figura 2:** Influência de células trofoblásticas e *T. gondii* no índice de apoptose (%) em células THP-1. Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, por 24 horas e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram tratadas apenas com meio de cultura. A reação foi realizada utilizando-se o kit FITC/Anexina V e analisadas por citometria de fluxo. As células marcadas apenas com anexina determinaram o índice de apoptose, pois representam a população de células que expressaram fosfatidilserina em suas membranas **(A)** Análise quantitativa (%) do índice de apoptose em células THP-1. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* após estímulo com os diferentes sobrenadantes de células BeWo e os respectivos controles; (°) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas e células THP-1 não infectadas. **(B)** Gráficos representativos em *dot spots* obtidos da análise por citometria de fluxo, sendo Q4-1 as células marcadas com anexina (valor médio representado dentro dos parênteses).

**Figura 2**

**A**

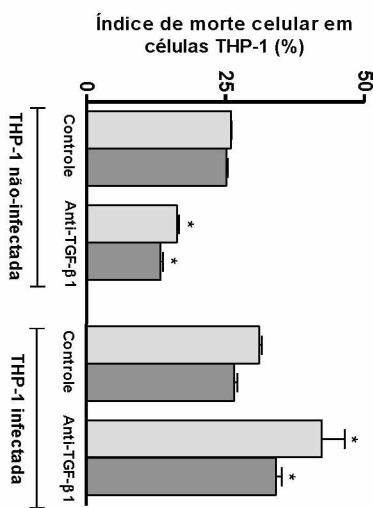


**B**

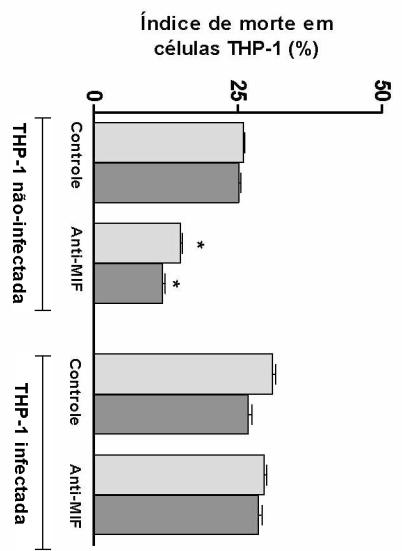


**Anexina**

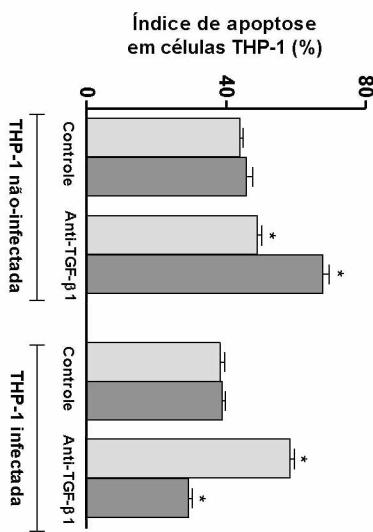
**Figura 3:** Secreção de MIF e TGF- $\beta$ 1 por células BeWo e influência destes componentes nos índices de morte celular em células THP-1. **(A e B)** Células BeWo foram plaqueadas e, após 24 horas, foram infectadas com *T. gondii* ou apenas acrescidas de meio completo (controle). A secreção de MIF e TGF- $\beta$ 1 foi dosada por ELISA. **(A)** Secreção de MIF e **(B)** TGF- $\beta$ 1 por células BeWo infectadas e não-infectadas com *T. gondii*. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células BeWo infectadas e células BeWo não-infectadas. **(C – F)** Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, neutralizados com anti-MIF ou anti-TGF- $\beta$ 1, por 24 horas, e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram estimuladas com sobrenadantes não neutralizados de células BeWo infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. **(C)** Índice de morte celular e **(D)** Índice de apoptose em células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo neutralizado com anti-MIF; **(E)** Índice de morte celular e **(F)** Índice de apoptose em células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo neutralizado com anti-TGF- $\beta$ 1. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicita, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células THP-1 estimuladas com os sobrenadantes neutralizados e células THP-1 estimuladas com os sobrenadantes não neutralizados (controle).



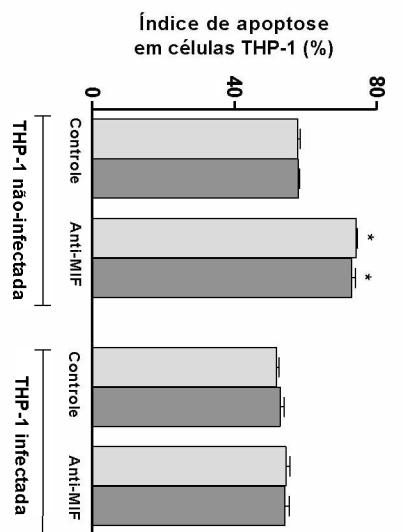
**E**



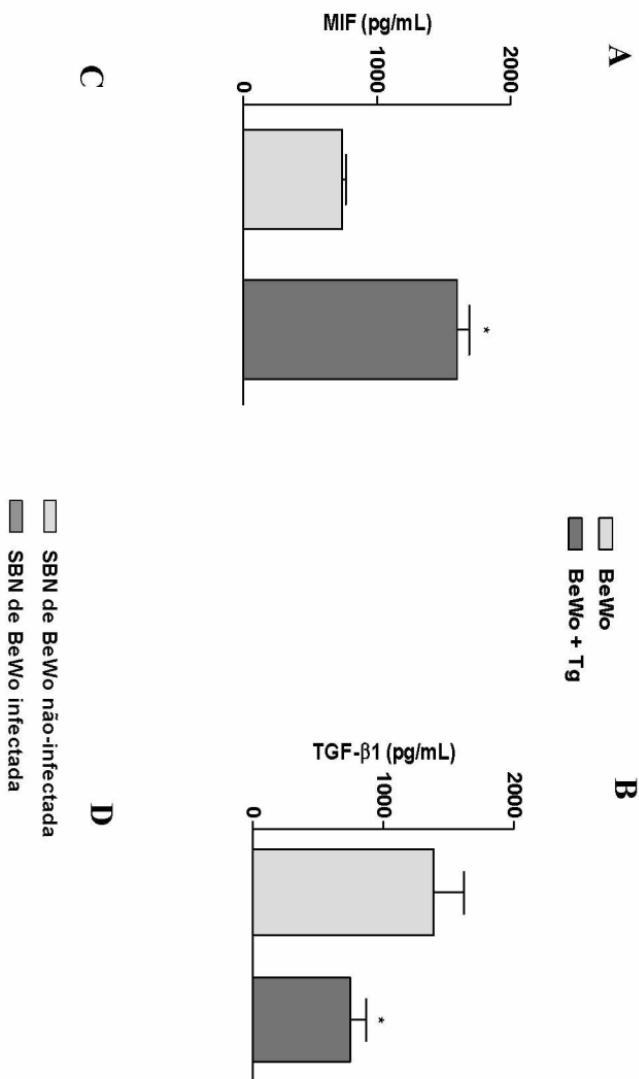
■ SBN de BeWo não-infectada  
■ SBN de BeWo infectada



**F**



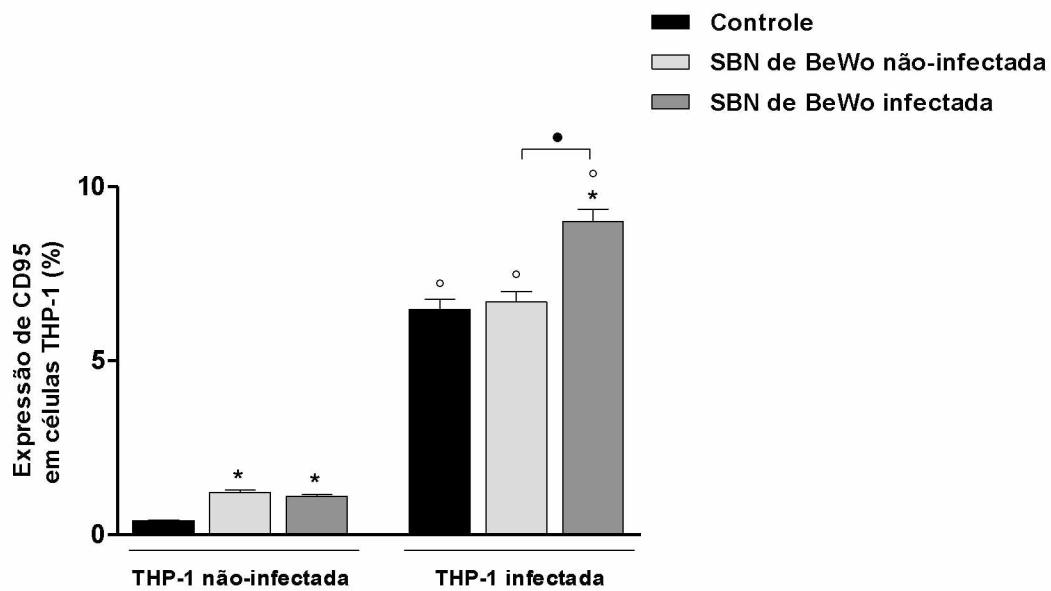
**Figura 3**



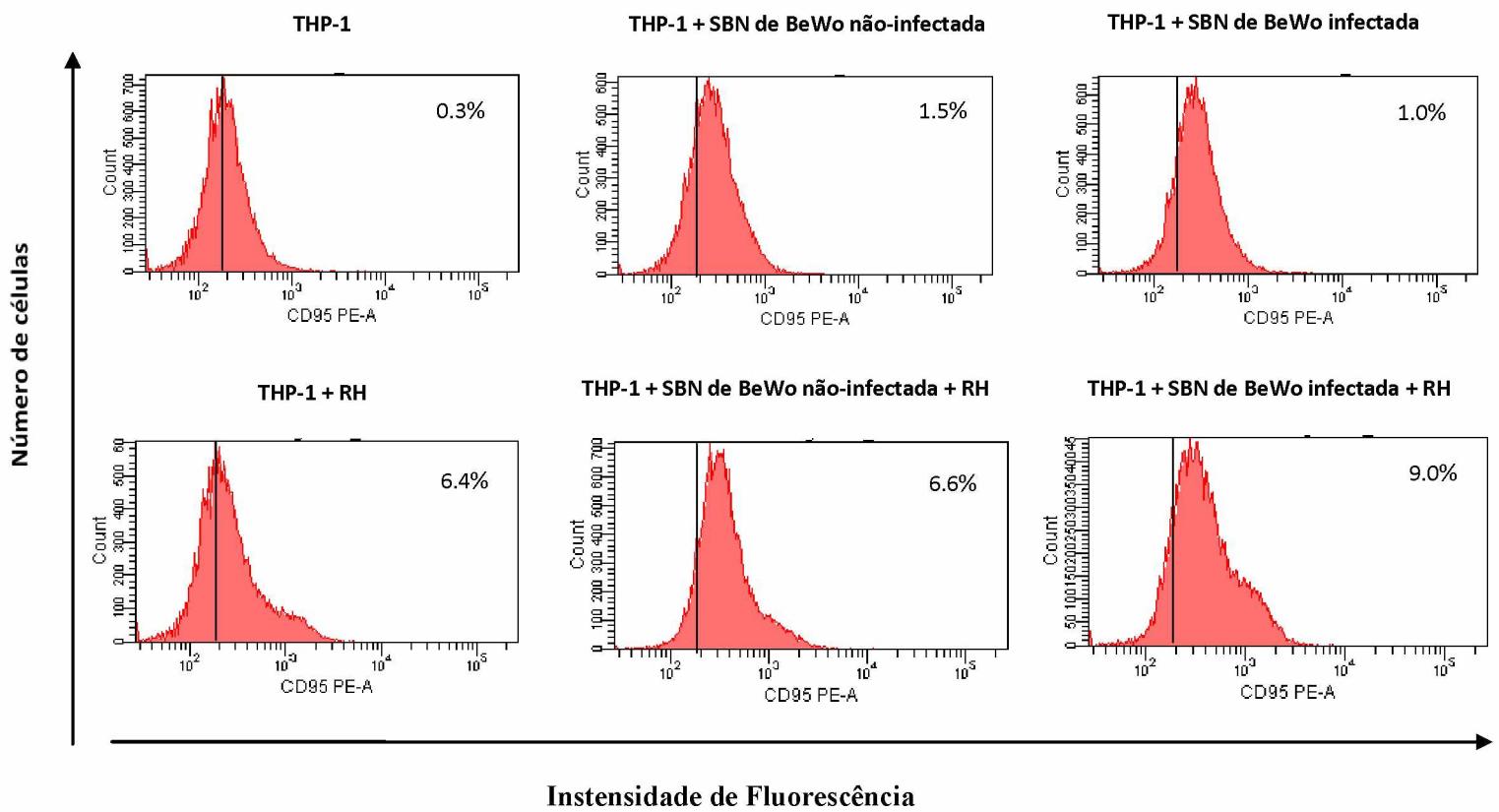
**Figura 4:** Influência de células trofoblásticas e *T. gondii* na expressão de receptor de morte Fas/CD95 em células THP-1. Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, por 24 horas e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram tratadas apenas com meio de cultura. Células THP-1 foram marcadas com anti-CD95/FITC ou incubadas com IgG irrelevante/FITC e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Análise quantitativa (%) da expressão de Fas/CD95 em células THP-1. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* após estímulo com os diferentes sobrenadantes de células BeWo e os respectivos controles; (●) Diferenças estatísticas entre células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas e àquelas estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, seguidas ou não de infecção por *T. gondii*; (°) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas e células THP-1 não-infectadas. **(B)** Histogramas representativos, obtidos da análise por citometria de fluxo, com porcentagem representando o valor médio da expressão de Fas/CD95 em cada condição analisada. A linha preta representa o valor médio da expressão de Fas/CD95 dos controles infectados ou não-infectados.

**Figura 4**

**A**



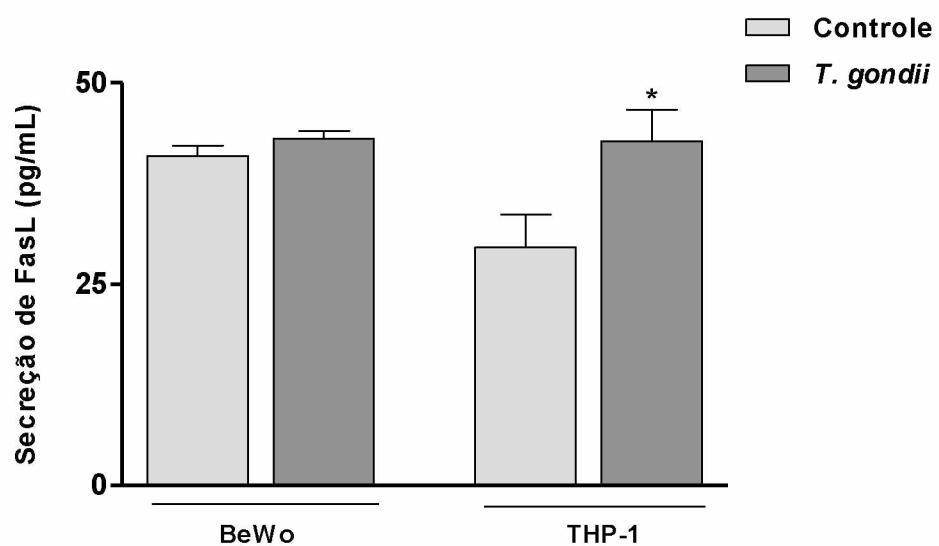
**B**



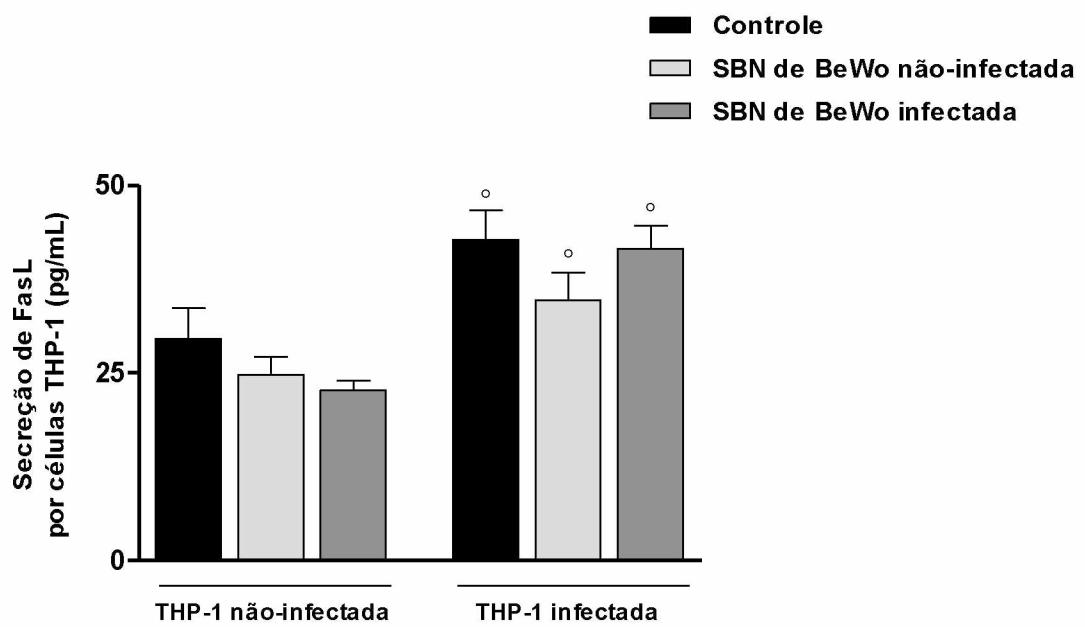
**Figura 5:** Secreção de FasL por células BeWo e THP-1 e influência de células BeWo na secreção de FasL por células THP-1. Células BeWo e THP-1 foram plaqueadas separadamente, e, após 24 horas, foram infectadas com *T. gondii* ou apenas acrescidas de meio completo (controle). A secreção de FasL foi dosada por ELISA. **(A)** Secreção de FasL por células BeWo e por células THP-1 infectadas e não-infectadas com *T. gondii*. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células BeWo ou THP-1 infectadas em relação aos respectivos controles (células BeWo ou THP-1 não-infectadas). **(B)** Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, por 24 horas e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram tratadas apenas com meio de cultura. A secreção de FasL foi determinada por ELISA e os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (°) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas e células THP-1 não-infectadas.

**Figura 5**

**A**



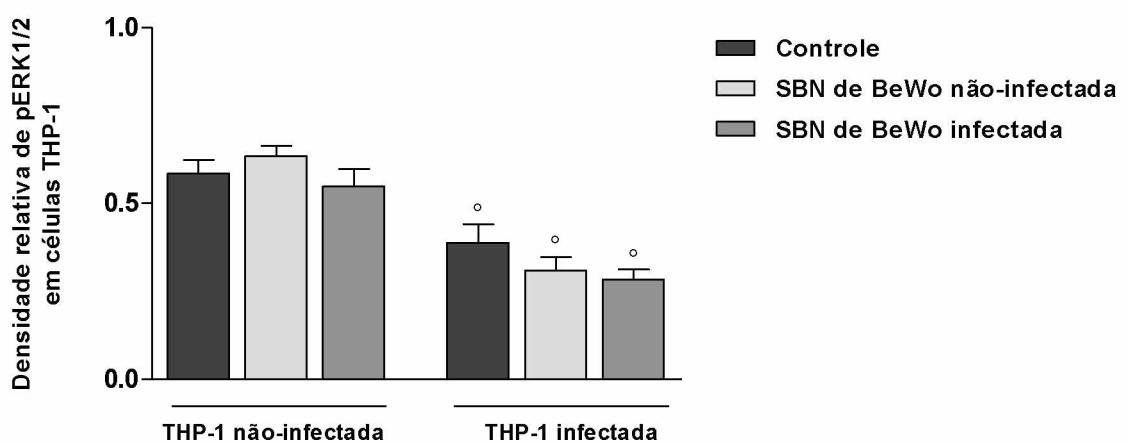
**B**



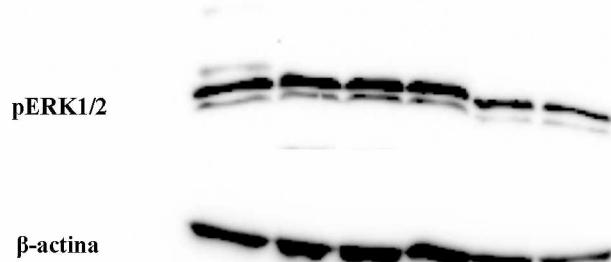
**Figura 6:** Influência de células trofoblásticas e *T. gondii* na expressão de ERK1/2 fosforilada por células THP-1. Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* por 24 horas e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram tratadas apenas com meio de cultura. Após 24 horas, células THP-1 foram lisadas e as proteínas totais foram mensuradas por Bradford e 100 $\mu$ g destas proteínas foram submetidas à técnica de Western blotting para detecção de ERK1/2 fosforilada e  $\beta$ -actina. **(A)** Análise por densitometria mostrando a densidade relativa de pERK1/2 obtida pela razão entre as bandas de pERK1/2 e  $\beta$ -actina em células THP-1. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ . ( ° ) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas e células THP-1 não infectadas. **(B)** Figura representativa de células THP-1, nas diferentes condições analisadas, mostrando as bandas específicas para pERK1/2 e  $\beta$ -actina.

**Figura 6**

**A**



**B**



	+	-	-	+	-	-
THP-1 + Meio	+	-	-	+	-	-
THP-1 + SBN de BeWo não-infectada	-	+	-	-	+	-
THP-1 + SBN de BeWo infectada	-	-	+	-	-	+

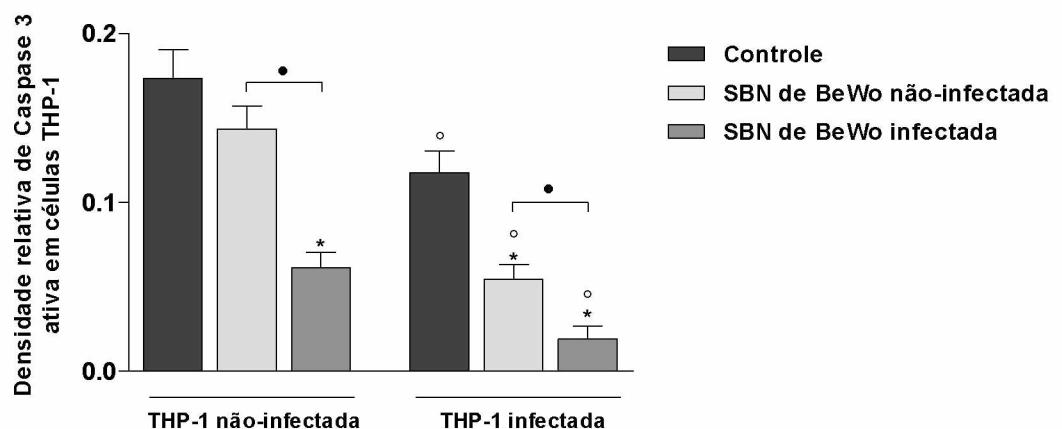
  

	THP-1 não-infectada			THP-1 infectada		
	+	-	-	+	-	-

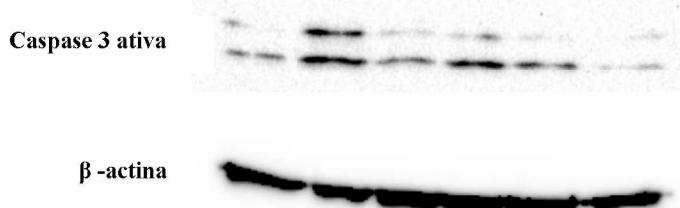
**Figura 7:** Influência de células trofoblásticas e *T. gondii* na expressão de caspase 3 ativa por células THP-1. Células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo, infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* por 24horas e, posteriormente, células THP-1 foram infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*. Como controles, células THP-1 não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, foram tratadas apenas com meio de cultura. Após 24horas, células THP-1 foram lisadas e as proteínas totais foram mensuradas por Bradford e 100 $\mu$ g destas proteínas foram submetidas à técnica de Western blotting para detecção de caspase 3 ativa e  $\beta$ -actina. **(A)** Análise por densitometria mostrando a densidade relativa de caspase 3 ativa, obtida pela razão entre as bandas de caspase 3 ativa e  $\beta$ -actina em células THP-1. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . (\*) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas ou não-infectadas com *T. gondii* após estímulo com os diferentes sobrenadantes de células BeWo e os respectivos controles; (●) Diferenças estatísticas entre células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas e àquelas estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, seguidas ou não de infecção por *T. gondii*; (°) Diferenças estatísticas entre células THP-1 infectadas e células THP-1 não infectadas. **(B)** Figura representativa de células THP-1, nas diferentes condições analisadas, mostrando as bandas específicas para caspase 3 ativa e  $\beta$ -actina.

**Figura 7**

**A**



**B**



	+	-	-	+	-	-
THP-1 + Meio	+	-	-	+	-	-
THP-1 + SBN de BeWo não-infectada	-	+	-	-	+	-
THP-1 + SBN de BeWo infectada	-	-	+	-	-	+
THP-1 não-infectada						THP-1 infectada

## REFERÊNCIAS

- ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infect Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1397-1401, 2004.
- ABRAHAMS, V.M.; KIM, Y.M.; STRASZEWSKI, S.L.; ROMERO, R.; MOR, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 51, n. 4, p. 275-82, 2004.
- AJZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. **J Infect Dis.**, v. 186, n. 5, p. 684-89, 2002.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 34, n. 10, p. 1185-96, 2004.
- AJZENBERG, D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? **Future Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 841-43, 2010.
- AKBAR, A.N., VUKMANOVIC-STEJIC, M.; TAAMS, L.S.; MACALLAN, D.C.: The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 231-37, 2007.
- AMODIO, G.; MUGIONE, A.; SANCHEZ, A.M.; VIGANÒ, P.; CANDIANI, M.; SOMIGLIANA, E.; RONCAROLO, M.G.; PANINA-BORDIGNON, P.; GREGORI, S. HLA-G expressing DC-10 and CD4(+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy. **Hum Immunol.**, v. 74, n. 4, p. 406-11, 2013.
- ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; CASTRO, A.S.; GOMES, A.O.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulate by *Toxoplasma gondii* strains type. **Placenta**, v. 30, n. 9, p. 785-91, 2009.
- ANGELONI, M.B.; GUIRELLI, P.M.; FRANCO, P.S.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; SILVA, N.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, T.W.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 973-82, 2013.

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

ARAUJO, E.J.A.; ZANILO, L.M.; VICENTINO, S.L.; GOIS, M.B.; ZANONI, J.N.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejuna myenteric plexus. **World J Gastroenterol.**, v. 21, n. 16, p. 4829-39, 2015.

BAI, L.; YU, Z.; WANG, C.; QIAN, G.; WANG, G. Dual role of TGF- $\beta$ 1 on Fas-induced apoptosis in lung epithelial cells. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 177, n. 3, p. 241-46, 2011.

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; PENA, J.D.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus* **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-30, 2007.

BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; LETTA, F.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; 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 E<sub>2</sub> production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-62, 2014.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J Exp Med.**, v. 195, n. 12, p. 1625-33, 2002.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbial.**, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves na interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 561-68, 2005.

BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma gondii*. **Subcell Biochem.**, v. 47, p. 198-207, 2008.

BARRIENTOS, G.; TIRADO-GONZÁLEZ, I.; KLAPP, B.F.; KARIMI, K.; ARCK, P.C.; GARCIA, M.G.; BLOIS, S.M. The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal-maternal interface. **J Reprod Immunol.**, v. 83, n. 1-2, p. 85-94, 2009.

BASTOS, L.M.; MACEDO, A.G.Jr.; SILVA, M.V.; SANTIAGO, F.M.; RAMOS, E.L.P.; SANTOS, F.A.A.; PIROVANI, C.P.; GOULART, L.R.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes from GRA2 protein are able to enhance mice survival in a model of experimental toxoplasmosis. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 6, n. 59, p. 1-11, 2016.

BEHNKE, M.S.; KHAN, A.; WOOTTON, J.C.; DUBEY, J.P.; TANG, K.; SIBLEY, L.D. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 108, n. 23, p. 9631–36, 2011.

BLADER, I.J.; MANGER, I.D.; BOOTHROYD, J.C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 26, p. 24223-31, 2001.

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, p. 458-76, 2009.

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

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

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol.**, v. 39, n. 11, p. 615 – 47, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.

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

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; PANAPOULOS, A.D.; WATOWICH, S.S.; MURRAY, P.J.; DENKERS, E.Y. Cutting edge: IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- $\alpha$  in host macrophages. **J Immunol.**, v. 174, n. 6, p. 3148-52, 2005.

BUTCHER, B.A.; FOX, B.A.; ROMMEREIM, L.M.; KIM, S.G.; MAURER, K.J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D.R.; BZIK, D.J.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control.

CAI, B.; CHANG, S.H.; BECKER, E.B.E.; BONNI, A.; XIA, Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of Bim<sub>EL</sub> at Ser-65. **G Biol Chem.**, v. 281, n. 35, p. 25215-22, 2006.

CAI, Y.; CHEN, H.; MO, X.; TANG, Y.; XU, X.; ZHANG, A.; LUN, Z.; LU, F.; WANG, Y.; SHEN, J. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis via a novel STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. **Cell Signal.**, v. 26, n. 6, p. 1204-12, 2014.

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

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

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 83-9, 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. 240-7, 2013.

CHANNON, J.Y.; SEGUIN, R.M.; KASPER, L.H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infect Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4822-26, 2000.

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

CHAOUAT, G. et al. Tolerance to the foetal allograft? **Am J Reprod Immunol.**, v. 63, n. 6, p. 624-36, 2010.

CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; HORNOY, P.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; BORY, J.P.; PINON, J.M. Preconception seroconversion and maternal seronegativity at

delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 489-90, 2002.

CHEN, Y.X.; ALLARS, M.; MAITI, K.; ANGELI, G.L.; ABOU-SEIF, C.; SMITH, R.; NICHOLSON, R.C. Factors affecting cytotrophoblast cell viability and differentiation: Evidence of a link between syncytialization and apoptosis. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 43, n. 5, p. 821-28, 2011.

CHEN, H.; JIN, Z.L.; XU, H. MEK/ERK signaling pathway in apoptosis of SW620 cell line and inhibition effect of resveratrol. **Asian Pac J Trop Med.**, v. 9, n. 1, p. 49-53, 2016.

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

COPPENS, L.; DUNN, J.D.; ROMANO, J.D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J.C.; JOINER, K.A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell.**, v. 125, n. 2, p. 261-74, 2006.

COSTA, A.F.; GOMES, S.Z.; LORENZON-OJEA, A.R.; MARTUCCI, M.; FARIA, M.R.; PINTO DDOS S, Jr.; OLIVEIRA, S.F.; LETTA, F.; PAULESU, L.; BEVILACQUA, E. Macrophage migration inhibitory factor induces phosphorylation of Mdm2 mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase: Role of this pathway in decidual cell survival. **Placenta**, v. 41, p. 27-38, 2016.

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

CURTIN, J.F.; DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J Immunol Methods.**, v. 265, n. 1-2, p. 49-72, 2002.

D'ANGELILLO, A.; LUNA, E.; ROMANO, S.; BISOGNI, R.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N.; PORTO, P.; VECCHIO, L.; PETERSEN, E.; ROMANO, M.F. *Toxoplasma gondii* Dense Granule Antigen 1 stimulates apoptosis of monocytes through autocrine TGF- $\beta$  signaling. **Apoptosis**, v. 16, n. 6, p. 551-562, 2011.

DARDÉ, M.L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 366-71, 2008.

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

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

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

DICKENS, S.L.; POWLEY, I.R.; HUGHES, M.A.; MACFARLANE, M. The “complexities” of life and death: Death receptor signaling platforms. **Exp Cell Res.**, v. 318, n. 11, p. 1269-77, 2012.

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

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

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 467-75, 2008.

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

DUBEY, J.P.; VAN WHY, K.; VERMA, S.K.; CHOUDHARY, S.; KWOK, O.C.; KHAN, A.; BEHNKE, M. S.; SIBLEY, L.D.; FERREIRA, L.R.; OLIVEIRA, S.; WEAVER, M.; STEWART, R.; SU, C. Genotyping *Toxoplasma gondii* from wildlife in Pennsylvania and identification of natural recombinants virulent to mice. **Vet Parasitol.**, v. 200, n. 1-2, 74-84, 2014.

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

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, n. 4, p. 190-196, 2010.

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

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

ESPINOZA, J.; EREZ, O.; ROMERO, R. Preconceptional antibiotic treatment to prevent preterm birth in women with a previous preterm delivery. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 194, n. 3, p. 630-637, 2006.

ETHERIDGE, R.D.; ALAGANAN, A.; TANG, K.; LOU, H.J.; TURK, B.E.; SIBLEY, L.D. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. **Cell Host Microbe.**, v. 15, n. 5, 537-50, 2014.

FAAS, M.M.; SPAANS, F.; DE VOS, P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. **Front Immunol.**, v. 5, n. 298, 2014.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DIILIO, C.; DELAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 5, p. 330-49, 2012.

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

FEREIG, R.M.; NISHIKAWA, Y. Peroxiredoxin 3 promotes IL-12 production from macrophages and partially protects mice against infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int.**, v. 65, n. 6, p. 741-8, 2016.

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.

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

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun.**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, 2005.

FOUROTAN-RADI, 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. **Transfus Med Rev.**, v. 30, n. 3, p. 116-22, 2016.

FRANCO, P.S.; RIBEIRO, M.; LOPES-MARIA, J.B.; COSTA, L.F.; SILVA, D.A.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.G.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. **Parasitol Res.**, v. 113, n. 7, p. 2655-64, 2014.

FRANCO, P.S.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; LETTA, F.; SHWAB, E.K.; SU, C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Front Microbiol.**, v. 6, n.181, 2015.

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

GADDI, P.J.; YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunol Cell Biol.**, v. 85, n. 2, p. 155-59, 2007.

GALISTEU, K. J.; MATTOS, C. B.; LELIS, A. G. L.; OLIVEIRA, M. P.; SPEJORIM, L. F.; JORDÃO, P.; ZAGO, A. P.; CURY, P. M.; MATTOS, L. C.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. **Rev Panam Infectol.**, v. 9, p. 24-29, 2007.

GALVAN-RAMIREZ MDE, L.; GUTIERREZ-MALDONADO, A.F.; VERDUZCO-GRIJALVA, F.; JIMENEZ, J.M. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. **Front Microbiol.**, v. 5, p. 1-14, 2014.

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

GOEBEL, S.; GROSS, U.; LUER, C.G.K. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. **J Cell Sci.**, v. 114, n. Pt 19, p. 3495-505, 2001.

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B.; FERMINO, M.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; BECHI, N.; PAULESU, L.R.; SANTOS, M.C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol.**, v. 178, n. 6, p. 2793-2802, 2011.

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

GUBBELS, M.J.; DURAISINGH, M.T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **Int J Parasitol.**, v. 42, n. 12, p. 1071-81, 2012.

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.; LETTA, F.; FERRO, E.A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 36, n. 10, p. 1106-14, 2015.

GYRD-HANSEN, M.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer. **Nat Rev Cancer.**, v. 10, n. 8, p. 561-74, 2010.

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T. I.; MANASTER, I.; GAZIT, R.; YUTKIN, V.; BENHARROCK, D.; PROGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nat Med.**, v. 12, n. 9, p. 149-63, 2006.

HAPPO, L.; STRASSER, A.; CORY, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **J Cell Sci.**, v. 125, n. Pt 5, p. 1081-7, 2012.

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

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

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

HIDE, G. Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. *Expert. Rev. Anti Infect Ther.*, v. 14, n. 3, p. 335-44, 2016.

HIPPE, D. et al. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. *Infect Immun.*, v. 76, n. 7, p. 2905-12, 2008.

HIPPE, D. et al. *Toxoplasma gondii* infection confers resistance against BimS-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax. *J Cell Sci.*, v. 122, n. Pt 19, p. 3511-21, 2009.

HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.*, v. 172, n. 6, p. 1561-6, 1995.

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

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

HWANG, I.; QUAN, J.H.; AHN, M.; AHMED, H.; CHA, G.; SHIN, D.; LEE, Y. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitol Res.*, v. 107, p. 1313-21, 2010.

IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Starvation of low-density lipoprotein-derived cholesterol induces bradyzoite conversion in *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.*, v. 7, n. 1, p. 248, 2014.

IP, Y.T.; DAVIS, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol.*, v. 10, n. 2, p. 205-19, 1998.

JIMENEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J.F.; MACLEOD, E.T.; LÜDER, C.G.K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors.*, v.3, n. 104, p. 1-15, 2010.

JIMENEZ-RUIZ, E.; MORLON-GUYOT, J.; DAHER, W.; MEISSNER, M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 209, n. 1-2, p. 18-25, 2016.

JONGERT, E.; LEMIERE, A.; VAN GINDERACHTER, J.; DE CRAEYE, S.; HUYGEN, K.; D'SOUZA, S. Functional characterization of in vivo effector CD4+ and CD8+ T cell responses in acute Toxoplasmosis: an interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells. **Vaccine**, v. 28, n. 13, p. 2556-64, 2010.

JONES, R.L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J.K.; SALAMONSEN, L.A. TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 217-232, 2006.

JORGENSEN, I.; RAYAMAJHI, M.; MIAO, E.A. Programmed cell death as a defence against infection. **Nat Rev Immunol.**, 2017.

KATO, S.; SUGIMURA, N.; NAKASHIMA, K.; NISHIHARA, T.; KOWASHI, Y. Actinobacillus actinomycetemcomitans induces apoptosis in human monocytic THP-1 cells. **J Med Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 293-8, 2005.

KAWAZOE, U. **Kawazoe U.** 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

KELLY, M.N.; KOLLS, J.K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J.D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I.A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun.**, v. 73, n. 1, p. 617-21, 2005.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.R.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

KIM, Y. M.; CHAIWORAPONGSA, T.; GOMEZ, R.; BUJOLD, E.; YOON, B. H.; ROTMENSCH, S.; THALER, H. T.; ROMERO, R. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 187, n. 5, p. 1137-42, 2002.

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

KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **J Fr Ophtalmol.**, v. 33, n. 5, p. 362-67, 2010.

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

KONG, L.; ZHANG, Q.; CHAO, J.; WEN, H.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; PAPPOE, F.; ZHANG, A.; XU, X.; CAI, Y.; LI, M.; LUO, Q.; ZHANG, L.; SHEN, J. Polarization of macrophages induced by *Toxoplasma gondii* and its impact on abnormal pregnancy in rats. **Acta Trop.**, v. 143, p. 1-7, 2015.

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am J Med.**, v. 118, n. 3, p. 212-16, 2005.

KRAVETZ, J. Congenital toxoplasmosis. **Clinical evidence [electronic resource]**, v. 28, pii: 0906, 2010.

KUMAR, P.; MAGON, N. Hormones in pregnancy. **Niger Med.**, v. 53, n. 4, p. 179-83, 2012.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev.**, v. 81, n. 2, p. 807-69, 2001.

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

LAGO, E. G.; NETO, E. C.; MELAMED, J.; RUCKS, A. P.; PRESOTTO, C.; COELHO, J. C.; PARISE, C.; VARGAS, P. R.; GOLDBECK, A. S.; FIORI, R. M. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatr Perinat Epidemiol.**, v. 21, n. 6, p. 525-531, 2007.

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

LAMONT, R.F. The role of infection in preterm labour and birth. **Hosp Med.**, v. 64, n. 11, p. 644-647, 2003.

LANG, C.; BROB, U.; CARSTEN, G.; LUER, K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.**, v. 100, n. 2, p. 191-203, 2007.

LEE, Y.J.; CHO, H.N.; SOH, J.W.; JHON, G.J.; CHO, C.K.; CHUNG, H.Y.; BAE, S.; LEE, S.J.; LEE, Y.S. Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. **Exp Cell Res.**, v. 291, n. 1, p. 251-66, 2003.

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

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

LIU, M.M.; YUAN, Z.G.; PENG, G.H.; ZHOU, D.H.; HE, X.H.; YAN, C.; YIN, C.C.; HE, Y.; LIN, R.Q.; SONG, H.Q.; ZHU, X.Q. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. **Parasitol Res.**, v. 106, n. 5, p. 1079-84, 2010.

LOPES, F.M.R.; GONÇALVES, D.D.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **Braz J Infect Dis.**, v. 11, n. 5, p. 496-506, 2007.

LOPES, C.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, N.M.; SILVA, D.A.; FERRO, E.A.; PENA, H.F.; SOARES, R.M.; GENNARI, S.M.; MINEO, J.R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiol Infect.**, v. 144, n. 9, p. 1865-75, 2016.

LÜDER, C.G.K.; GROSS, U.; LOPES, M. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 10, p. 480-86, 2001.

LÜDER, C.G.K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROSS, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **Int J Parasitol.**, v. 33, n. 8, p. 833-44, 2003.

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

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

LUN, Z.R.; LAI D.H.; WEN, Y.Z.; ZHENG, L.L.; SHEN, J.L.; YANG, T.B.; ZHOU, W.L.; QU, L.H.; HIDE, G.; AYALA, F.J. Cancer in the parasitic protozoans *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 112, n. 29, p. 8835-42, 2015.

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3352-57, 2003.

MACHALA, L.; KODYM, P.; MALÝ, M.; GELENEKY, M.; BERAN, O.; JILICH, D. Toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Epidemiol Mikrobiol Imunol**, v. 64, n. 2, p. 59-65, 2015.

MARTIN, S. J. et al. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. **J Biol Chem.**, v. 271, n. 46, p. 28753-6, 1996.

MARTIN, K.R.; OHAYON, D.; WITKO-SARSAT, V. Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation. **Swiss Med Wkly.**, v. 145:w14056, 2015.

MAYHEW, T. M. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. **Histol Histopathol.**, v. 16, n. 4, p. 1213-24, 2001.

MCMASTER, M. T.; ZHOU, Y.; FISHER, S. J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. **Semin Nephrol.**, v. 24, n. 6, p. 540-7, 2004.

MELO, M.B.; JENSEN, K.D.; SAEIJ, J.P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-95, 2011.

MOLESTINA, R.E.; PAYNE, T.M.; COPPENS, I.; SINAI, A.P. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Sci.**, v. 116, n. Pt 21, p. 4359-71, 2003.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 12, p. 1965-75, 2004.

MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis.**, v. 47, n. 4, p. 554-56, 2008.

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

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M.M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 269-85, 2011.

NAGAMATSU, T.; SCHUST, D.J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. **Reprod Sci.**, v. 17, n. 3, p. 209-18, 2010b.

NAGATA, S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. **Adv Immunol.**, v. 57, p. 129-44, 1994.

NAITO, M.; NAGASHIMA, K.; MASHIMA, T.; TSURUO, T. Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. **Blood.**, v. 89, n. 6, p. 2060-6, 1997.

NARUSE, K.; INNES, B.A.; BULMER, J.N.; ROBSON, S.C.; SEARLE, R.F.; LASH, G.E. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. **J Reprod Immunol.**, v. 86, n. 2, p. 148-150, 2010.

NELSON, D.M. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. **Placenta**, v. 17, n. 7, p. 387-91, 1996.

NELSON, N.M.; JONES, A.R.; CARMEN, J.C.; SINAI, A.P.; BURCHMORE, R.; WASTLING, J.M. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, v. 76, n. 2, p. 828-844, 2008.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-156, 2002.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-156, 2003.

NGUYEN, T.D.; BIGAIGNON, G.; MARKINE-GORIAYNOFF, D.; HEREMANS, H.; NGUYEN, T. N.; WARNIER, G.; DELMEE, M.; WARNY, M.; WOLF, S. F.; UYTTEHOVE, C.; VAN SNICK, J.; COUTELIER, J.P. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. **J Med Microbiol.**, v. 52, n. Pt 10, p. 869-76, 2003.

NIKOLETOPOULON, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1833, n. 12, p. 3448-59, 2013.

NORWITZ, E.R.; SCHUST, D.J.; FISHER, S.J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 19, p. 1400-8, 2001.

OLIVEIRA, J.G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.D.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, G.L.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- $\gamma$ . **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 691-698, 2006.

ONG, Y.C.; REESE, M.L.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 37, p. 28731-740, 2010.

PARDI, G.; MARCONI, A. M.; CETIN, I. Pathophysiology of intrauterine growth retardation: role of the placenta. **Acta Paediatr Suppl.**, v. 423, p. 170-2, 1997.

PASSOS, S.T.; SILVER, J.S.; O'HARA, A.C.; SEHY, D.; STUMHOFER, J.S.; HUNTER, C.A. IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. **J Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1776-83, 2010.

PATTILLO, R.A.; GEY, G.O. The establishment of a cell line of human hormone – synthesizing trophoblastic cells *in vitro*. **Cancer Research.**, v. 28, n. 7, p. 1231-36, 1968.

PAYNE, T.M.; MOLESTINA, R.E.; SINAI, A.P. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- $\kappa$ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. **J Cell Sci.**, v. 116, n. Pt 21, p. 4345-58, 2003.

PENG, H.J.; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **J Parasitol.**, v. 97, n. 4, p. 620-8, 2011.

PETSAS, G.; JESCHKE, U.; RICHTER, D.U.; MINAS, V.; HAMMER, A.; KALANTARIDOU, S.; TOTH, B.; TSATSANIS, C.; FRIESE, K.; MAKRIGIANNAKIS, A. Aberrant expression of corticotropin-releasing hormone in pre-eclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis. **Mol Hum Reprod.**, v. 18, n. 11, p. 535-45, 2012.

PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; KLEIN, J.P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblast. **Immunol Cell Biol.**, v. 83, n. 5, p. 483-489, 2005b.

PLAKS, V.; BIRNBERG, T.; BERKUTZKI, T.; SELA, S.; BENYASHAR, A.; KALCHENKO, V.; MOR, G.; KESHET, E.; DEKEL, N.; NEEMAN, M.; JUNG, S. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. **J Clin Invest.**, v. 118, n. 12, p. 3954-65, 2008.

PLATTNER, F.; SOLDATI-FRAVE, D. Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. **Annu Rev Microbiol.**, v. 62, p. 471-87, 2008.

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

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

REESE, M.L.; ZEINER, G.M.; SAEIJ, J.P.; BOOTHROYD, J.C.; BOYLE, J.P. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 108, n. 23, 9625–30, 2011.

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Infectious diseases in the fetus and newborn infant. In: (Ed.). **Toxoplasmosis**. 5<sup>a</sup> ed., 2001.

REY, L. **Parasitologia**, 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 2001.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, n. 2, p. 264-96, 2012.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; OUAISSE, A.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 325-33, 2012.

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

SAEIJ, J.P.; BOYLE, J.P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L.D., BROOKE-POWELL, E.T.; AJIOKA, J.W.; BOOTHROYD, J.C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v. 314, n. 5806, 1780–1783, 2006.

SAEIJ, J.P.; COLLER, S.; BOYLE, J.P.; JEROME, M.E.; WHITE, M.W.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 324–7, 2007.

SAKAGUCHI S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25 + CD4 + regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.

SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M.K.; MORDUE, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol Res.**, v. 107, n. 2, p. 253-260, 2010.

SALAMONE, G.; FRACCAROLI, L.; GORI, S.; GRASSO, E.; PAPARINI, D.; GEFFNER, J.; PEREZ-LEIROZ, C.; RAMHORST, R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Hum Reprod.**, v. 27, n. 9, p. 2598-606, Sep 2012.

SEPULVEDA-ARIAS, J. C.; GOMEZ-MARIN, J.E.; BOBIC, B.; NARANJO-GALVIS, C.A.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Med Infect Dis.**, v. 12, n. 6 PtA, p. 592-601, 2014.

SHAPIRA, S.; HARB, O.S.; MARGARIT, J.; MATRAJT, M.; HAN, J.; HOFFMANN, A.; FREEDMAN, B.; MAY, M.J.; ROOS, D.S.; HUNTER, C.A. Initiation and termination of NF-κB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci.**, v. 118, n. 15, p. 3501-08, 2005.

SHAWN, I.; STRASZOWSKI-CHAVEZ, V.M.; ABRAHAMNS, V.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocr Rev.**, v. 26, n. 7, p. 877-97, 2005.

SHEINER, L.; SANTOS, J.M.; KLAGES, N.; PARUSSINI, F.; JEMMELY, N.; FRIEDRICH, N.; WARD, G.E.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. **Mol Microbiol.**, v. 77, n. 4, p. 912-29, 2010.

SHIN, G.C.; KIM, C.; LEE, J.M.; CHO, W.S.; LEE, S.G.; JEONG, M.; CHO, J.; LEE, K. Apigenin-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species and activation of ERK1/2 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. **Chem Biol Interact.**, v. 182, n. 1, p. 29-36, 2009.

SHWAB, E.K.; JIANG, T.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 46, n. 2, p. 141-6, 2016.

SIBLEY, L.D., BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82-5, 1992.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Ann rev microbial.**, v. 62, p. 329-351, 2008.

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

SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res.**, v. 105, n. 4, p. 893-98, 2009.

SIM, S.; YONG, T.S.; PARK, S.J.; IM, K.; KONG, Y.; RYU, J.S.; MIN, D.Y.; SHIN, M.H. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. **J Immunol.**, v. 174, n. 7, p. 4279-88, 2005.

SMITH, S.C.; BAKER, P.N.; SYMONDS, E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 177, n. 1, p. 57-65, 1997.

SMITH, S.C.; LEUNG, T.N.; TO, K.F.; BAKER, P.N. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 183, n. 3, p. 697-99, 2000.

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

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; CAMILO-COURA, L. Estudo Prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 36, n. 4, p. 1-14, 2003.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J.**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, 2011.

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocr Rev.**, v. 26, n. 7, p. 877-97, Dec 2005.

STURGE, C.R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun.**, v. 82, n. 8, p. 3090-7, 2014.

SULLIVAN, W. J., JR.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, n. 3, p. 717-733, 2012.

SUZUKI, Y.; COLNEY, F.K.; REMINGTON, J.S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis.**, v. 159, n. 4, p. 790-94, 1989.

SYKES, L.; MACINTYRE, D.A; YAP, X.J; TEOH, T.G.; BENNETT, P.R. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators Inflamm.**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

TANTBIROJN, P.; CRUM, C.P.; PARAST, M.M. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 639-45, 2008.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S.J.; TANG, K.; BEATTY, W.L.; HAJJ, H.E.; JEROME, M.; BEHNKE, M.S.; WHITE, M.; WOOTTON, J.C.; SIBLEY, L.D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1776–1780, 2006.

TENTER, A.M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 104, n. 2, p. 364-369, 2009.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-6, 1998.

TSUCHIYA S.; YAMABE M.; YAMAGUCHI Y.; KOBAYASHI Y.; KONNO T.; TADA K. Establishment and characterization of a human acute monocyte leukemia cell line. **Int J Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, 1980.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J.A.; DE LEÓN-NAVA, M .A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 114-21, 2009.

VAUX, D.L.; HAECKER, G.; STRASSER, A. An evolutionary perspective on apoptosis. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 777-9, 1994.

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDE, M.; PINON, J.; AUBERT, D. Toxoplasma strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends in Parasitol**, v. 20, n. 4, p. 160-62, 2004.

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K.; SIMPSON, R.; HOLFELS, E.; HOPKINS, J.; MACK, D.; METS, M. B.; SWISHER, C. N.; PATEL, D.; ROIZEN, N.; STEIN, L.; STEIN, M.; WITHERS, S.; MUI, E.; EGWUAGU, C.; REMINGTON, J.; DORFMAN, R.; MCLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clin Infect Dis**, v. 23, n. 5, p. 1055-60, 1996.

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

WANG, Y.; YIN, H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 384, 2015.

WANG, H.; ENGSTROM, A.K.; XIA, Z. Cadmium impairs the survival and proliferation of cultured adult subventricular neural stem cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases. **Toxicology**, v. 380, p. 30-7, 2017.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v. 68, p. 251-306, 1980.

WHITE, M.W.; RADKE, J.R.; RADKE, J.B. *Toxoplasma* development - turn the switch on or off? **Cell Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 466-72, 2014.

WHITLEY, G.S.; DASH, P.R.; AYLING, L.J.; PREFUMO, F.; THILAGANATHAN, B.; CARTWRIGHT, J.E. Increased apoptosis in first trimester extravillous trophoblasts from pregnancies at higher risk of developing preeclampsia. **Am J Pathol**, v. 170, n. 6, p. 1903-9, 2007.

WILSON, D.C.; GROTBREG, G.M.; LIU, K.; ZHAO, Y.; FRICKEL, E.M.; GUBBELS, M.J.; PLOEGH, H.L.; YAP, G. S. Differential regulation of effector- and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. **PLoS Pathol.**, v. 6, n. 3, p. 1-17, 2010.

WU, Z.M.; YANG, H.; LI, M.; YEH, C.C.; SCHATZ, F.; LOCKWOOD, C.J.; DI, W.; HUANG, S.J. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidua cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. **Placenta**, v. 33, n. 3, p. 188-94, 2012.

WU, L.; WANG, X.; LI, Y.; LIU, Y.; SU, D.; FU, T.; GUO, F.; GU, L.; JIANG, X.; CHEN, S.; CAO, J. *Toxoplasma gondii* ROP18: potential to manipulate host cell mitochondrial apoptosis. **Parasitol Res.**, v. 115, n. 6, p. 2415-22, 2016.

XIA, W.; XIE, C.; JIANG, M.; HOU, M. Improved survival of mesenchymal stem cells by macrophage migration inhibitory factor. **Mol Cell Biochem.**, v. 404, n. 1-2, p. 11-24, 2015.

YAMAMOTO, M.; STANDLEY, D.M.; TAKASHIMA, S.; SAIGA, H.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; KUBO, E.; ITO, H.; TAKAURA, M.; MATSUDA, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. **J Exp Med.**, v. 206, n. 12, 2747-60, 2009.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol.**, v. 14, n. 2, p. 109-21, 2014.

ZHANG, L.; ZHAO, M.; JIAO, F.; ZU, X.; LIU, X.; JIANG, Y.; ZHANG, H.; OU, X.; HU, X. Interferon gamma is involved in apoptosis of trophoblast cells at the maternal-fetal interface following *Toxoplasma gondii* infection. **Int J Infect Dis.**, v. 30, p. 10-6, 2015.

ZHAO, L.; SHAO, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; HE, Y.; WANG, L.; KONG, B.; QU, X. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell mediated by human extravillous trophoblasts. **Sci Rep.**, v. 6, p. 204-9, 2016.

ZHOU, X.W.; KAFSACK, B.F.C.; COLE, R.N.; BECKETT, P.; SHEN, R.F.; CARRUTHERS, V.B. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34233-44, 2005.

## ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –

Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;

e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br) ; [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS COMUNICA QUE AS PESQUISAS CUJOS DADOS SERÃO OBTIDOS EXCLUSIVAMENTE COM O USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE NÃO NECESSITAM DE ANÁLISE ÉTICA POR UM CEP.

EXEMPLOS DESSAS CÉLULAS: HeLa; BeWo; JEG-3; HTR-8; HFF; Caco-2.

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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