

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MARCOS PAULO OLIVEIRA ALMEIDA

**Heme oxigenase-1 na infecção de células trofoblásticas vilosas e extravilosas
humanas por *Toxoplasma gondii***

UBERLÂNDIA

2018

MARCOS PAULO OLIVEIRA ALMEIDA

Heme oxigenase-1 na infecção de células trofoblásticas vilosas e extravilosas humanas por *Toxoplasma gondii*

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

Área de Concentração: Biologia Celular de Doenças Infecciosas e Degenerativas

Orientador(a): Profa. Dra. Neide Maria da Silva

UBERLÂNDIA

2018

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

A447h
2018 Almeida, Marcos Paulo Oliveira, 1994
Heme oxigenase-1 na infecção de células trofoblásticas vilosas e
extravilosas humanas por *Toxoplasma gondii* / Marcos Paulo Oliveira
Almeida. - 2018.
119 f. : il.

Orientadora: Neide Maria da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.209>
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Heme
Oxigenase-1 - Teses. 4. Trofoblastos - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus, à minha mãe, aos meus Anjos da Guarda e às energias positivas que me movem e que me permitem acordar e batalhar a cada dia por meus ideais, que me proporcionam suporte físico e mental para enfrentar as situações e dificuldades de nossa vivência nesta Terra. Obrigado Deus por toda proteção, por colocar as pessoas adequadas em minha vida, por perdoar os meus erros e limitações, e por me guiar há quase 24 anos nos caminhos que construíram a minha essência. Amém.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Neide Maria da Silva,

Neide, obrigado por me ter me acolhido em seu laboratório há 4 anos e meio, orientando-me durante meus períodos de graduação e mestrado. Obrigado por aceitar e acreditar em minhas ideias e sugestões para a melhoria de nossas investigações. Agradeço imensamente por ter confiado a mim os cuidados de seu laboratório e de tantas outras responsabilidades, bem como por todos os ensinamentos experimentais que se preocupou em me transmitir, inclusive nos momentos em que fomos juntos para a bancada. Durante este tempo, por muitas vezes, a senhora representou uma mãe para mim, por isso, eu lhe agradeço muito pelas palavras de apoio e esperança, bem como pelos conselhos e broncas nos momentos pertinentes, pois contribuíram para meu crescimento. Obrigado por respeitar minhas opiniões e por compreender minhas dificuldades e limitações, enquanto seu aluno e seu amigo. Você é exemplo de ética profissional, de respeito à docência e à pesquisa, e acima de tudo, a senhora é o meu maior exemplo de competência e seriedade em tudo o que faz. Como você mesmo brinca, e o que de fato é uma verdade, a senhora têm e me ensinou a ter “mãos” para a pesquisa científica e para a vida! Obrigado por compartilharmos tantas experiências de nossas vivências, por nossa relação de amizade construída que, para mim, está acima de publicações ou qualquer outra conquista acadêmica. Aos poucos, estou deixando o seu grupo de pesquisa para trilhar outros rumos em minha vida. O meu cansaço é grande, mas a partir dele, tive a certeza de que tentei fazer o meu melhor para você e para o bom andamento de seu laboratório. Neide, obrigado por tudo. A admiração que tenho pela senhora, ficará sempre em minha memória. Que Deus possa continuar lhe abençoando a cada dia. Adoro você de todo o meu coração!

Agradecimentos Fundamentais

Agradeço à colaboradora e amiga, Profa. Bellisa de Freitas Barbosa,

Grande parte dos meus conhecimentos construídos até hoje são advindos de seus ensinamentos. Agradeço imensamente por todos os seus auxílios nos mais diversos experimentos que me ensinou, em especial nas reações de *western blotting* que nos dão um grande trabalho! Além disso, agradeço também por ter me cedido alíquotas de seus reagentes quando precisei! Obrigado por todas as suas sugestões pertinentes, pelas experiências de vida, por sempre me receber com tanta atenção e respeito para que eu pudesse tirar minhas dúvidas. Agradeço pelas palavras de conforto e pela calma que me transmite nas situações mais difíceis de desabafo. Você representa um grande exemplo de professora, de pesquisadora e, principalmente, de ser humano. Que Deus continue lhe amparando sempre, preparando-lhe um lugar merecido de paz e ternura no céu. Obrigado imensamente pela amizade e por tudo! Adoro você Bê!

Agradeço à Profa. Eloisa Amália Vieira Ferro,

Eloisa, no início de minha graduação, há quase 6 anos, você me convidou para trabalhar em seu laboratório. Desde então, eu só tenho a lhe agradecer por tudo o que me possibilitou. Obrigado por me permitir utilizar seus equipamentos quando precisei, por colaborar com as reações para detecção de citocinas realizadas neste trabalho, através da doação de alíquotas de seus kits de Elisa e, principalmente, agradeço imensamente por ter cedido a linhagem de células BeWo, bem como a linhagem HTR-8/SVneo, para que eu pudesse desenvolver ambos os trabalhos de minha graduação e mestrado. Obrigado por todos os conselhos e palavras de incentivo que me transmitiu, por ter me apresentado à interface materno-fetal humana, linha de pesquisa com a qual desenvolvi tanta afinidade, e por ter aceitado o convite para ser membro titular de minha banca de defesa, ao avaliar a presente dissertação. A você, eu deixo o meu muito obrigado. Que Deus continue lhe abençoando sempre!

Agradeço aos queridos companheiros de jornada, Ester Borges, Loyane Bertagnolli e Mário Cézar. Vocês três, cada qual da sua maneira, possuem importante contribuição com meu crescimento profissional e pessoal. Obrigado pelos momentos de amizade, de descontração, de desabaços e apoio psicológico, dos quais tanto necessitei e ainda necessito. Eu agradeço muito por compreenderem minha “maneira de ser” e por torcerem e sempre desejarem boas energias a mim, incentivando-me na busca de ser uma pessoa melhor. Além disso, obrigado por depositarem em mim toda a confiança e responsabilidade do trabalho experimental e por me permitirem contribuir com a realização de seus experimentos. Esterzinha, Loyzinha e Mário, sou eternamente grato por tudo o que aprendi com vocês. Tenham a certeza de que sempre estarão no meu coração e na minha memória. Eu desejo que Deus abençoe a vida de vocês, mais e mais a cada dia!

Agradeço ao Prof. Tiago Mineo e à Dra. Caroline Martins Mota. Prof. Tiago, agradeço-lhe por ter aceitado o convite para ser membro suplente de avaliação desta dissertação, muito obrigado por colaborar conosco na realização de meu mestrado, permitindo-me utilizar o aparelho ChemiDoc e me cedendo as valiosas alíquotas dos anticorpos e de outros reagentes. Agradeço ainda, por sempre se mostrar à disposição em me sanar minhas dúvidas experimentais, dando-nos sugestões e contribuindo para a melhoria deste trabalho! Carolzinha, a você me faltam palavras para descrever o quanto sou grato. Querida, muito obrigado por toda a sua ajuda empenhada em cada pequeno detalhe de minhas reações de western blotting, desde sugestões metodológicas a até me acompanhar em todos os momentos em que precisei “revelar minhas membraninhas”. Entre tantas e tantas ajudas experimentais que me proporcionou, eu deixo também o meu muito obrigado pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelas trocas de experiências de vida e pelo suporte psicológico de amizade que me forneceu durante estes últimos meses. Se existem anjos próximos a mim, com certeza, você é um deles. Adoro você Carol! Agradeço também à técnica Ana Cláudia Pajuaba pela bondade, pelo auxílio com a utilização do ChemiDoc e por sempre se mostrar à disposição para me ajudar! A vocês três, eu deixo o meu muito obrigado por terem me recebido com tanto apoio e amizade no Laboratório de Imunoparasitologia. Que Deus os abençoe sempre!

Agradeço à equipe do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução pelos momentos de convívio agradável e, em especial, agradeço às companheiras, Rafaela José, Eliana Balga Milian, Mayara Ribeiro, Pâmela Guirelli e Andressa Castro, pela constante disponibilidade nas diversas vezes em que me auxiliaram a centrifugar minhas placas de cultura, bem como por estarmos sempre compartilhando de células ou parasitos, ajudando uns aos outros! Obrigado meninas pela troca de experiências de vida, pessoais e de laboratório, pelos momentos de descontração e pelas palavras de conforto e incentivo. Que Deus ilumine a trajetória de cada uma de vocês sempre. Sentirei saudades, mas as terei sempre no coração!

Agradeço as queridas Profa. Angelica Gomes e Profa. Idessania Costa. Angelica lhe agradeço por contribuir com a presente dissertação, ao ter aceitado meu convite para ser membro titular de minha banca de defesa. Muito obrigado também pela oportunidade de ter compartilhado ótimos momentos com você que, para todos nós, representa um exemplo de professora, pesquisadora e, acima de tudo, de ser humano, com um grande coração cheio de bondade, humildade e ternura. Como o seu próprio nome lhe define, uma pessoa angelical. Que Deus lhe ilumine sempre Angel! Idessania lhe agradeço também por avaliar a presente dissertação, ao ter aceitado meu convite para ser membro suplente de minha banca de defesa. Obrigado pelos momentos em que pude estar próximo a você, uma professora e pesquisadora de grande competência, e uma pessoa carismática que esbanja felicidade, humildade e gentileza. Que Deus lhe abençoe sempre Ide!

Agradeço aos professores do PPGBC e do Setor de Histologia e Embriologia pelo excelente convívio e por todos os aprendizados que me proporcionaram! Especialmente, agradeço aos Profs. Daniele Lisboa e Paulo Faria pela relação de amizade e por terem prontamente aceitado participar de meu exame de qualificação, contribuindo de forma essencial à minha formação. Além disso, agradeço Alberto Moraes e Marcelo Beletti pelas ótimas relações pessoais e por sempre se mostrarem prontos a sanar minhas dúvidas relacionadas às análises estatísticas e de imagens. A todos vocês, deixo o meu muito obrigado por contribuírem com meu crescimento pessoal e profissional!

Agradeço à coordenadora do PPGBC, Profa. Tatiana Tomiasso, e à secretária, Renata Giembinsky, pela ótima relação de amizade, pelos momentos de descontração e pela prontidão em sempre me auxiliarem no que precisei enquanto aluno do programa. Gosto muito de vocês. Fiquem com Deus!

Agradeço à Profa. Nívia Coelho, do Instituto de Química da UFU, através do intermédio de sua aluna de mestrado, Weida Rodrigues, por me ceder as alíquotas do reagente cloreto de bário, as quais foram essenciais ao presente estudo. Obrigado Nívia pela prontidão em colaborar com nosso experimento e, em especial, obrigado Weida por me recepcionar e atender de maneira tão amável!

Agradeço a meu grande amigo, Fábio Alves Sobrinho, por tantos anos de amizade sincera e construtiva. Obrigado por fazer parte do meu cotidiano através da constante troca de experiências. Agradeço por depositar em mim tanta confiança, por me conhecer tão bem e ter me compreendido nos momentos em que mais necessitei. Com seu apoio e ombro amigo, o decorrer deste mestrado com certeza foi mais leve. Adoro você amigo!

Agradeço a todos os funcionários de limpeza da UFU com os quais tive a oportunidade de conviver. Em especial, agradeço às funcionárias Elva, Maria Vitória (Dona Vitória) e Naudicley, pelo excelente cuidado com a limpeza de nossos espaços no bloco 2B e, em especial, por zelarem tão bem dos laboratórios de Imunopatologia e Histologia. Vocês são exemplos de responsabilidade profissional, de educação, de bondade e humildade. Que Deus abençoe vocês sempre meninas!

Agradeço às agências de fomento, Fapemig e CNPq, por financiarem nossos projetos de pesquisa, e especialmente, agradeço à Capes por ter me concedido a bolsa financeira durante estes 2 anos de mestrado!

Durante 6 anos, esta universidade foi minha segunda casa.. ou até talvez a primeira. Neste lugar, ganhei e perdi amigos, chorei e sorri, trabalhei e estudei arduamente, e acima de tudo, descobri o que somos enquanto ser humano. Por isso, obrigado a todas as pessoas com as quais tive a oportunidade de conviver, pois vocês, cada um da sua maneira, contribuíram de alguma forma para a construção da minha personalidade e dos meus ideais.

À UFU, eu agradeço por ter me acolhido durante todos estes anos.

“Que sua vida seja um canteiro de oportunidades.

O maior de todos os sonhos é ser feliz,

e ser feliz não é ser perfeito,

mas usar suas lágrimas para irrigar a tolerância,

usar suas falhas para corrigir as rotas,

usar sua garra para correr atrás de seus projetos.

Quando você errar o caminho, não desista.

Dê sempre uma nova chance a si e aos outros.

Lembre-se: ser feliz é aplaudir a vida

mesmo diante das raias”.

Augusto Cury

Fake Plastic Trees

(Radiohead, "The Bends", © 1995 EMI Records Limited)

Her green plastic watering can
For a fake chinese rubber plant
In the fake plastic earth

That she bought from a rubber man
In a town full of rubber plans
To get rid of itself

It wears her out, it wears her out
It wears her out, it wears her out

She lives with a broken man
A cracked polystyrene man
Who just crumbles and burns

He used to do surgery
For girls in the eighties
But gravity always wins

And it wears him out, it wears him out
It wears him out, it wears him out

She looks like the real thing
She tastes like the real thing
My fake plastic love

But I can't help the feeling
I could blow through the ceiling
If I just turn and run

And it wears me out, it wears me out
It wears me out, it wears me out

And if I could be who you wanted
If I could be who you wanted
All the time, all the time

RESUMO

Heme oxigenase-1 (HO-1) é a enzima responsável pelo catabolismo da heme, tendo como produtos, a liberação de ferro (Fe^{2+}) e a formação de monóxido de carbono (CO) e bilirrubina. Os efeitos conjuntos do CO e bilirrubina conferem à HO-1 um papel citoprotetor, sendo que o controle de sua expressão e atividade requer, principalmente, a fosforilação diferencial das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). HO-1 está também envolvida na resposta imune a microrganismos infecciosos, como *Toxoplasma gondii*, um protozoário parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, uma doença grave em indivíduos imunocomprometidos e mulheres gestantes. A placenta humana, por sua vez, é uma estrutura essencial à comunicação materno-fetal, cujas células trofoblásticas vilosas e extravilosas são populações celulares de origem embrionária/fetal, que contribuem para a geração de uma tolerância imune no organismo materno, importante à manutenção da gestação. Devido à contribuição de HO-1 com as funções desempenhadas por estas células, as quais são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, o presente estudo avaliou a influência desta enzima na infecção de células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) e extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) por este parasito. Para isso, células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não com *T. gondii*, foram tratadas ou não com hemina, porfirina indutora de HO-1, sendo em seguida analisadas quanto aos índices de viabilidade celular e proliferação de *T. gondii*, e em relação à expressão e atividade de HO-1, associadas à fosforilação/ativação de p38, JNK e ERK1/2 (MAPKs) e à produção de citocinas (MIF, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF). Em ambas as células, os resultados revelaram que, embora o tratamento com hemina tenha reduzido a viabilidade celular, a proliferação de *T. gondii* foi aumentada frente ao estímulo com a porfirina. Quando infectadas, células BeWo tiveram menor expressão e atividade da enzima, as quais se mantiveram inalteradas em células HTR-8/SVneo. Neste contexto, a ativação de p38-MAPK foi associada à expressão reduzida de HO-1 em células BeWo, ao passo que em células HTR-8/SVneo, a fosforilação de JNK foi aumentada pelo tratamento com hemina. Além disso, a infecção associada, ou não, à indução de HO-1, foi capaz de aumentar a produção de MIF, IL-6 e IL-8 por células BeWo ou HTR-8/SVneo, sendo que o mecanismo envolvendo a produção de óxido nítrico (NO), para o controle da infecção por *T. gondii*, não atuou em ambas as linhagens. Em conjunto, nossos dados sugerem que a infecção por *T. gondii* reduz a expressão e atividade de HO-1, principalmente, em células BeWo.

Palavras-chave: heme oxigenase-1, trofoblasto, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Heme oxygenase-1 (HO-1) is an enzyme responsible for heme catabolism, with the iron (Fe^{2+}) release in addition to carbon monoxide (CO) and bilirubin formation, that present a cytoprotective role, wherein the control of their expression and activity, mainly requires, differential phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). HO-1 is also involved in the immune response to infective microorganisms, such as *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite protozoan that causes toxoplasmosis, a severe disease in immunocompromised individuals and pregnant women. The human placenta, in turn, is an essential structure to maternal-fetal communication, whose villous and extravillous trophoblast cells are embryonic/fetal cell populations, which contribute to generation of an immune tolerance in the maternal organism, important for pregnancy maintenance. Due to the contribution of HO-1 on functions of these cells, which are susceptible to *T. gondii* infection, the present study evaluated the influence of this enzyme on the infection of human villous trophoblast cells (BeWo line) and extravillous (HTR-8/SVneo line) by the parasite. BeWo and HTR-8/SVneo cells were infected or not, with *T. gondii*, treated or not with hemin, a porphyrin and inductor of HO-1, being analyzed to the cellular viability and *T. gondii* proliferation rates. Also the HO-1 expression and activity associated with the phosphorylation/activation of p38, JNK e ERK1/2 (MAPKs) and cytokines production (MIF, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF) were analyzed. In both cells, the results showed that although treatment with hemin reduced slightly the cellular viability, *T. gondii* proliferation was increased with porphyrin stimulus. Under infection, BeWo cells presented lower expression and activity of the enzyme, which remained unchanged in HTR-8/SVneo cells. In this context, activation of p38-MAPK was associated with reduced HO-1 expression in BeWo cells, whereas in HTR-8/SVneo cells, phosphorylation of JNK was enhanced by treatment with hemin. In addition, infection, with or without induction of HO-1, was able to increase the production of MIF, IL-6 and IL-8 by BeWo or HTR-8/SVneo cells. Taken together, our data suggest that *T. gondii* infection decrease the HO-1 expression and activity, mainly, in BeWo trophoblast cells.

Keywords: heme oxygenase-1, trophoblast, *Toxoplasma gondii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da invasão trofoblástica e placentação humana	18
Figura 2. Análise da viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo frente aos tratamentos com hemina	54
Figura 3. Influência dos tratamentos com hemina na proliferação de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR-8/SVneo	56
Figura 4. Expressão de HO-1 por células BeWo e HTR-8/SVneo.....	58
Figura 5. Atividade de HO-1 por células BeWo e HTR-8/SVneo	61
Figura 6. Expressão de <i>p</i> -p38-MAPK, <i>p</i> -JNK e <i>p</i> -ERK1/2 por células BeWo e HTR-8/SVneo	64
Figura 7. Produção de citocinas por células BeWo e HTR-8/SVneo.....	67

LISTA DE ABRIVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
APC	Célula apresentadora de antígeno
BVR	Biliverdina redutase
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CT	Citotrofoblasto
CTe	Citotrofoblasto extraviloso
CTv	Citotrofoblasto viloso
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO	Monóxido de carbono
CytP450	Complexo enzimático citocromo P450
DC	Célula dendrítica
DO	Densidade Óptica
egCTe	Citotrofoblasto extraviloso endoglandular
ERK1/2	Quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2
evCTe	Citotrofoblasto extraviloso endovascular
Fe²⁺/Fe³⁺	Ferro em estado iônico ferroso (²⁺) e férrico (³⁺)
FGR	Restrição de crescimento fetal
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio (água oxigenada)
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HO-1/2/3	Isoformas 1, 2 e 3 de heme oxigenase
hPL	Hormônio lactogênio placentário humano
HSP32	Proteína de choque térmico de 32kDa (sinônimo de HO-1)
iCTe	Citotrofoblasto extraviloso intersticial
IFN-γ	Interferon gama
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IUGR	Restrição de crescimento intrauterino
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIF	Fator de inibição da migração de macrófagos
MIP-1α/β	Proteínas inflamatórias de macrófagos 1 tipo α e β
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
Nrf-2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O₂	Oxigênio molecular
p38-MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PGE₂/PGJ₂	Prostaglandina E ₂ e Prostaglandina J ₂
PKA/C/G	Proteínas quinase A, C e G
PPAR	Receptor nuclear ativado por proliferador de peroxissomo
p/v	Peso/volume
RIPA	Tampão de lise para ensaio de radioimunoprecipitação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAPK	Proteína quinase ativada por estresse
Ser/ThrK	Serina/treonina quinase
sGC	Guanilato ciclase solúvel
ST	Sinciciotrofoblasto
STAT	Fator transdutor de sinais e ativador de transcrição
TG	Trofoblasto gigante
Th	Perfil de linfócito T <i>helper</i> (auxiliar)
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
TLR	Receptores semelhantes a “ <i>toll</i> ”
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito (ou célula) T regulador(a)
TyrK	Tirosina quinase
uDC	Célula dendrítica uterina
uNK	Linfócito <i>natural killer</i> uterino
v/v	Volume/volume
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Placenta: os aspectos estruturais e funcionais das células trofoblásticas	15
1.2. Mecanismos de resposta imunológica na interface materno-fetal.....	19
1.3. Heme oxigenase-1: aspectos funcionais e mecanismos intracelulares associados.....	22
1.4. Expressão e atividade de HO-1 na interface materno-fetal	25
1.5. <i>Toxoplasma gondii</i> : aspectos gerais, características estruturais e ciclo biológico	28
1.6. Mecanismos de resposta imune do hospedeiro à infecção por <i>T. gondii</i>	31
1.7. Toxoplasmose congênita e <i>T. gondii</i> na interface materno-fetal.....	34
1.8. Linhagens celulares como modelos de trofoblasto humano	36
1.9. Participação de HO-1 na imunopatologia de doenças infecciosas	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral	41
3.2. Objetivos Específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Cultura e manutenção de células BeWo, HTR-8/SVneo e HeLa	42
4.2. Manutenção <i>in vitro</i> do clone 2F1 (cepa RH) de <i>T. gondii</i> e infecção experimental.....	43
4.3. Tratamentos com Hemina.....	44
4.4. Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT.....	44
4.5. Quantificação da proliferação de <i>T. gondii</i> por ensaio de β -galactosidase	45
4.6. <i>Western Blotting</i> para detecção da expressão de HO-1 e da fosforilação de proteínas pertencentes à via de sinalização das MAPK (<i>p</i> -p38-MAPK, <i>p</i> -JNK e <i>p</i> -ERK1/2)	46
4.7. Quantificação dos níveis intracelulares de heme e dosagem de bilirrubina	48
4.8. Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	50
4.9. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por dosagem de nitrito	51
4.10. Análises estatísticas	52
5. RESULTADOS	53
5.1. Análise do efeito de hemina na viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo.....	53
5.2. O estímulo com hemina eleva os índices de proliferação de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	55
5.3. A expressão de HO-1 em células BeWo é reduzida frente à infecção por <i>T. gondii</i> e elevada por hemina, mantendo-se inalterada em células HTR-8/SVneo	57

5.4. Em infecção por <i>T. gondii</i> , a atividade funcional de HO-1 é reduzida em células BeWo e inalterada em células HTR-8/SVneo	59
5.5. Em infecção por <i>T. gondii</i> , a fosforilação de p38-MAPK em células BeWo demonstra associação com a indução de HO-1	62
5.6. A infecção por <i>T. gondii</i> , e/ou o tratamento com hemina, aumenta as secreções das citocinas MIF, IL-6 e IL-8 por células BeWo ou HTR-8/SVneo.....	65
5.7. O mecanismo dependente da produção de óxido nítrico (NO) não atua em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	68
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Placenta: os aspectos estruturais e funcionais das células trofoblásticas

A gestação representa uma condição fisiológica, na qual o organismo materno se adapta a importantes modificações orgânicas visando à geração de uma tolerância imunológica, em virtude de sua contínua exposição aos antígenos de natureza paterna presentes no conceito em desenvolvimento (BULLA et al., 2004; MAKRIGIANNAKIS et al., 2008; ROBERTSON; MOLDENHAUER, 2014). Com vistas à garantia do sucesso gestacional, os organismos animais estabeleceram em seu curso evolutivo importantes mecanismos de comunicação materno-embrionária, sendo que a placenta se desenvolveu como uma estrutura direcionada ao estabelecimento do diálogo materno-fetal, dos mamíferos eutérios ou placentários (GRIFFITH; WAGNER, 2017). Assim, esta estrutura é definida como um órgão transitório, formado pela constante interação de diferentes tipos de células decíduais maternas, com o trofoblasto, uma linhagem celular de origem embrionária/fetal que se diferencia em subpopulações com características morfológicas e funcionais distintas, essenciais à gestação (GUDE et al., 2004; BURTON; JAUNIAUX, 2015) (Figura 1).

O estabelecimento da estrutura placentária na espécie humana ocorre por meio da placentação, a qual é tida como um conjunto de eventos que se iniciam com a aposição e a adesão ao epitélio uterino pelo blastocisto. Este é constituído de uma massa celular interna conhecida como embrioblasto, que formará a estrutura corpórea do embrião/feto, e de uma camada celular externa denominada trofoectoderma, que originará a futura placenta (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016; SILVA; SERAKIDES, 2016). Em sequência, as células do trofoectoderma, também consideradas como células tronco trofoblásticas, iniciam a fase de implantação embrionária ao adquirirem capacidade migratória e invadirem a mucosa uterina (endométrio), diferenciando-se progressivamente em duas amplas subpopulações celulares, o citotrofoblasto viloso (CTv) e o citotrofoblasto extraviloso (CTe) mononucleares (GUDE et al., 2004; BURTON; JAUNIAUX, 2015; STEINBERG; ROBINS, 2016). Em paralelo, os fibroblastos endometriais se especializam em células decíduais estromais uterinas, por meio da decidualização, processo que compreende um conjunto de alterações celulares importantes, desencadeadas por estímulos provenientes do trofoblasto circunjacente (GUDE et al., 2004; VELICKY; KNÖFLER; POLLHEIMER, 2016). De maneira similar, as células decíduais também são capazes de secretar fatores que atuarão sobre as células trofoblásticas, respondendo com um “*feedback*” adequado para a regulação dos processos de migração e

invasão pelo trofoblasto, com vistas à progressão adequada da placentação (GODBOLE et al., 2011; LALA; NANDI, 2016; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016).

À medida que as células do CTv proliferativo entram em contato com a decídua materna, uma parcela adquire capacidade fusogênica para a geração e a manutenção de uma massa celular multinuclear não proliferativa denominada sinciciotrofoblasto (ST), a qual se dispõe externamente em relação ao CTv, formando as vilosidades coriônicas primárias (GRAHAM; LALA, 1992; GUDE et al., 2004). Por sua vez, o ST produz e secreta enzimas de degradação inicial dos componentes de matriz extracelular da mucosa uterina, visando à implantação adequada do blastocisto e o estabelecimento da circulação útero-placentária primordial (DONNELLY; CAMPLING, 2014; BURTON; JAUNIAUX, 2015). Além disso, devido à sua extensa superfície de contato, o ST participa diretamente das trocas de substâncias entre o conceito e o sangue materno, além de sintetizar importantes hormônios de manutenção da gestação, como o lactogênio placentário (hPL) e a gonadotrofina coriônica (hCG) (JI et al., 2013; BURTON; FOWDEN, 2015).

Em paralelo ao desenvolvimento dos vilos primários, células provenientes do mesoderma extraembrionário do conceito migram para o interior da camada de CTv e, ali, desenvolvem um tecido de caráter mesenquimal, constituindo dessa forma as vilosidades secundárias (GRAHAM; LALA, 1992; GUDE et al., 2004). Progressivamente, células endoteliais respondem a sinais pró-angiogênicos provenientes deste microambiente e são recrutadas para o interior destas últimas estruturas a fim de formarem os capilares sanguíneos fetais dispostos pelo mesênquima, propiciando o surgimento dos vilos placentários terciários como um último e permanente estágio morfológico, os quais são considerados a unidade formadora da barreira placentária (GRAHAM; LALA, 1992; BULLA et al., 2004; GUDE et al., 2004; SILVA; SERAKIDES, 2016). Dependendo do seu grau de crescimento e proliferação celular, os vilos terciários podem se alojar como flutuantes no espaço intervilloso placentário, ou se desenvolverem o bastante, a ponto de se ancorarem diretamente ao tecido decidual por adesão direta do CTv, o qual se organiza em colunas celulares (GRAHAM; LALA, 1992; GUDE et al., 2004; KNÖFLER, 2010; JI et al., 2013). A partir das extremidades basais dos vilos de ancoragem, as células do CTv adquirem um padrão migratório e invasivo particulares, e originam a linhagem de células citotrofoblásticas extravilosas (CTe) (LYALL, 2006; JI et al., 2013; STEINBERG; ROBINS, 2016). Este fenótipo específico é gerado pela comunicação direta das células de CTv com a matriz extracelular decidual, o que induz a uma elevação das taxas de proliferação celular seguida de um aumento da motilidade e invasividade destas células rumo ao tecido decidual, passando, de fato, a serem tratadas como CTe (APLIN, 2000;

ANIN; VINCE; QUENBY, 2004). À medida que migram e invadem a decídua, as células do CTe se diferenciam em pelo menos três subtipos relevantes descritos até o momento descritos: o CTe intersticial (iCTe), o CTe endovascular (evCTe) e o CTe endoglandular (egCTe) (ANIN; VINCE; QUENBY, 2004; BULLA et al., 2004; LYALL, 2006; JI et al., 2013; HUPPERTZ; WEISS; MOSER, 2014).

O iCTev dá continuidade à intensa migração da linhagem extravilosa, alcançando regiões profundas do útero próximas ao miométrio, a fim de garantir uma adesão correta e eficaz da placenta (JI et al., 2013). Já o evCTe, adquire características funcionais similares às do endotélio decidual, invadindo as artérias espiraladas uterinas e se intercalando entre as células endoteliais propriamente ditas que as compõem, remodelando os vasos sanguíneos locais e regulando assim, as taxas de angiogênese e de fluxo sanguíneo a favor do embrião/feto (GUDE et al., 2004; MALTEPE; FISHER, 2015). Por fim, o egCTe é um tipo celular capaz de migrar rumo às glândulas uterinas, invadindo-as e as remodelando para melhor aporte nutricional ao embrião/feto, até o completo estabelecimento da circulação útero-placentária (MOSER et al., 2010; MOSER; HUPPERTZ, 2017). Como um evento adicional, quando imersas na decídua, grupos de células do iCTe também são capazes de se fusionarem originando as chamadas células trofoblásticas gigantes (TG), as quais representam o último estágio de diferenciação deste tipo celular (GUDE et al., 2004; JI et al., 2013). Apesar de se comportarem como sincícios isolados, as células do TG se diferem do sinciciotrofoblasto, proveniente do CTv por não possuírem um caráter invasivo e por não sintetizarem hormônios gestacionais, tais como hPL e hCG (LOKE, 1990; GRAHAM; LALA, 1992).

Embora os eventos acima descritos sejam relativos à placentação e à biologia do trofoblasto na espécie humana, muitos destes conhecimentos foram obtidos por meio de estudos morfológicos e estruturais em outros modelos animais, como em ratos e camundongos, os quais apresentam importantes similaridades aos humanos, desde o estabelecimento de uma placenta hemocorial, até o compartilhamento de linhagens trofoblásticas análogas a ambos os organismos (JOHN; HEMBERGER, 2012; SILVA; SERAKIDES, 2016). Em suma, a placentação é regulada por mecanismos intracelulares que controlam a expressão gênica no trofoblasto, bem como pela interação constante deste tipo celular com células do sistema imune, evitando assim, a geração de complicações placentárias oriundas de invasões trofoblásticas insuficientes, como a pré-eclâmpsia e a restrição do crescimento intrauterino (IUGR), ou excessivas, como o desenvolvimento de placentas com variados níveis de implantação aprofundada (KNÖFLER, 2010; HUPPERTZ, 2011; GUPTA et al., 2015; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016).

Figura 1

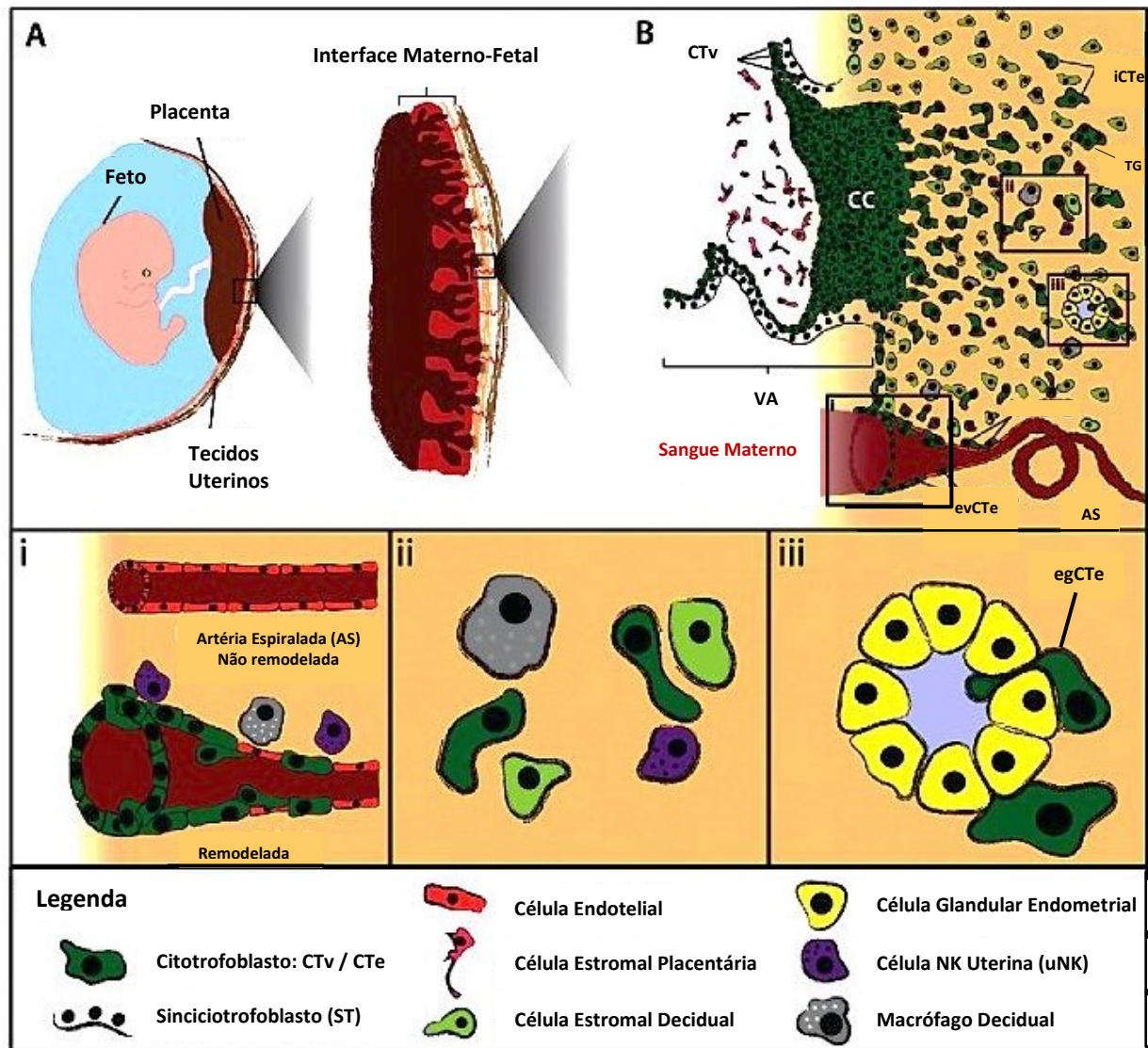


Figura 1. Representação da invasão trofoblástica e placentação humana. (A) A placenta conecta o embrião/feto aos tecidos uterinos, estabelecendo um contato vascular materno-fetal. Este órgão é constituído por vilosidades coriônicas, as quais permanecem em contato direto com o sangue materno, caracterizando a placenta humana como hemocorial. O local específico em que a placenta se dispõe em união com a decídua materna, é a chamada interface materno-fetal. (B) Durante o início da gestação, as células do citotrofoblasto viloso (CTv) se fundem umas as outras dando origem ao sinciciotrofoblasto (ST), uma massa celular multinuclear que reveste externamente os vilos placentários. Por sua vez, a camada de ST garante as trocas de gases e nutrientes entre mãe e conceito e secreta hormônios placentários, como o hCG e o hPL. Os vilos de ancoragem (VA) se aderem diretamente à decídua através das colunas celulares (CC), a partir das quais as células de CTv, ali presentes, diferenciam-se em uma nova população celular, o chamado citotrofoblasto extraviloso (CTe). As células de CTe são invasivas e capazes de se alojarem nos tecidos deciduais, fusionando-se em células trofoblásticas gigantes (TG), terminalmente diferenciadas, ou se subdividindo em outras populações celulares: (i) as células de CTe endovascular (evCTe); (ii) as células de CTe intersticial (iCTe); (iii) e as células de CTe endoglandular (egCTe). As células de evCTe (i) invadem a decídua, migram às artérias espiraladas (AS) e colonizam o lúmen destas, conduzindo às progressivas etapas do remodelamento destes vasos para o estabelecimento do fluxo sanguíneo placentário adequado. As células de iCTe (ii) ao invadirem os tecidos deciduais, estabelecem importantes interações celulares com macrófagos residentes e células *natural killer* uterinas (uNK), a fim de regular os mecanismos que regem a placentação adequada. Por fim, as células de egCTe (iii) representam um tipo celular capaz de invadir as glândulas uterinas e se interpor entre as células epiteliais que as constitui, com vistas a garantir um melhor aporte nutricional ao embrião, até o estabelecimento da circulação útero-placentária definitiva (Figura retirada e adaptada de VELICKY; KNÖFLER; POLLHEIMER, 2016).

1.2. Mecanismos de resposta imunológica na interface materno-fetal

A geração de um estado de tolerância imune por parte do organismo materno é essencial à aceitação e manutenção do conceito em desenvolvimento, uma vez que ao carregar consigo antígenos paternos, este se comporta como um enxerto semialogênico vulnerável às reações de rejeição imunológica maternas (MEDAWAR, 1953 apud MICHELON et al., 2006; MOR; ALDO; ALVERO, 2017). Assim, o estabelecimento de um equilíbrio entre as respostas imunes pró e anti-inflamatórias que vise à integridade gestacional, é fundamental, e nisto, o trofoblasto têm essencial contribuição, ao modular a atividade de células imunes que migram à placenta por meio da produção de diferentes mediadores imunológicos (SAITO, 2000; ENTRICAN, 2002; MOR; CARDENAS, 2010; MOR et al., 2011).

Com vistas ao entendimento desta imunotolerância materno-fetal em humanos, estudos prévios demonstraram que o ST e as células do CTv não expressam as moléculas clássicas de antígeno leucocitário humano (HLA) I e II que constituem as cadeias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I e II, respectivamente, conferindo-lhes a capacidade de não ativarem respostas imunes iniciais, mediadas por linfócitos T (MORRIS et al., 1998; KING et al., 2000; APPS; GARDNER; MOFFETT, 2008). Sabe-se que apenas as moléculas HLA-E e HLA-G, componentes não clássicos não polimórficos (ou baixo polimorfismo) de MHC classe I, são expressos na placenta humana, e que esta expressão é restrita às populações de CTe. HLA-G se liga a receptores em linfócitos *natural killer* uterinos (uNK) diminuindo sua atividade citotóxica. Além disso, HLA-G se liga a receptores em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, assim como com as células apresentadoras de antígenos (APCs), configurando maior tolerância imune no microambiente placentário (ROUAS-FREISS et al., 1997; TANAKA et al., 2000; SZEKERES-BARTHO, 2002; APPS; GARDNER; MOFFETT, 2008; FERREIRA et al., 2017; MOFFETT; CHARAZA; COLUCCI, 2017). Células trofoblásticas, assim como as APCs profissionais, também são capazes de exercer o reconhecimento antigênico de patógenos que se possam se instalar no microambiente placentário, através da expressão diferencial de receptores de reconhecimento padrão semelhantes a “*toll*” (TLRs) (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

Logo, a gestação é caracterizada por distintas fases nas quais há alternâncias entre os perfis de resposta imune predominante, e eventos de primeiro trimestre gestacional como a implantação embrionária, as etapas da placentação, bem como algumas reações decíduais iniciais do segundo trimestre, necessitam de um microambiente altamente inflamatório para ocorrerem, mediado por citocinas polarizadoras de células T “*helper*” 1 (Th1), ou pró-

inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-8, interferon (IFN)- γ e o fator de necrose tumoral (TNF) (WEGMANN et al., 1993; MOR; CARDENAS, 2010; OTUN et al., 2011; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016).

Entretanto, durante grande parte do segundo trimestre e em praticamente todo o terceiro, a supressão deste microambiente inflamatório é fundamental às reparações das lesões deciduais ocasionadas pelos eventos iniciais da gestação, bem como para a manutenção da tolerância imune materna (KOGA; ALDO; MOR, 2009; MOR; CARDENAS, 2010). Por sua vez, esta supressão imunológica na interface materno-fetal é marcada pela alteração do perfil pró-inflamatório (Th1) para o anti-inflamatório (Th2), através da secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e o fator transformador de crescimento (TGF)- β pelo trofoblasto, além de fatores hormonais como progesterona, estrógenos, prostaglandinas, e hCG, os quais mantêm o perfil Th2 e contribuem para a ativação da resposta imune humoral contra a rejeição fetal, via produção de imunoglobulinas (Ig) específicas por linfócitos B ativados (PICCINNI, 2002; CHALLIS et al., 2009; ROBINSON; KLEIN, 2012; SCHUMACHER; COSTA; ZENCLUSSEN, 2014). Ao fim do terceiro trimestre, o perfil de mediadores Th1 é reestabelecido em função do parto, no qual células inflamatórias são atraídas ao miométrio e neste local induzem a reações imunes locais para o aumento da contratilidade uterina, culminando na expulsão do feto e da placenta pelo organismo materno (KOGA; ALDO; MOR, 2009). Em suma, a predominância do perfil Th2 sobre Th1, em grande parte do curso gestacional, é de grande valia ao seu sucesso, visto que reações inflamatórias exacerbadas na placenta podem levar ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia, à incidência de partos prematuros e de abortos espontâneos (CHALLIS et al., 2009).

Além disso, citocinas não menos importantes, como IL-6 e o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), também contribuem para a fisiologia normal da placenta, bem como para manutenção deste balanço Th1/Th2 (RAGHUPATHY et al., 1999; BEVILACQUA et al., 2014). MIF, ao ser expresso por ambas as células de CTv e CTe (ARCURI et al., 1999; 2007), bem como pelo endométrio grávidico (ARCURI et al., 2001), é capaz de atenuar reações inflamatórias exacerbadas na decídua, através da regulação da atividade lítica de células uNK para a garantia de uma invasão trofoblástica adequada, e pelo controle da migração randômica de macrófagos ao microambiente placentário (ARCURI et al., 2006; BEVILACQUA et al., 2014). IL-6, por sua vez, comporta-se como uma citocina de caráter pleiotrópico ao permear entre os perfis Th1 e Th2 (DEALTRY; O'FARRELL; FERNANDEZ, 2000). No contexto gestacional, IL-6 pode ser um fator pró-inflamatório produzido pela decídua, intensificando complicações gestacionais como a pré-eclâmpsia

(LOCKWOOD et al., 2008), bem como pode ser secretada pelo trofoblasto como um fator anti-inflamatório, induzindo a uma resposta imune humoral marcada pela síntese de moléculas de IgG específicas por células B ativadas, mantendo assim, o perfil de tolerância imune (LEE, 1992; MARGNI; ZENCLUSSEN, 2001).

No decorrer de todas as suas etapas, a gestação humana necessita da participação de variados tipos de células da imunidade inata e adaptativa, que migram à decídua e, ali, estabelecem importantes interações com trofoblasto (RAGHUPATHY, 1997). Neste sentido, células uNK representam cerca de 70% dos leucócitos presentes na decídua e possuem papel fundamental no remodelamento dos vasos sanguíneos uterinos, por secretarem citocinas e quimiocinas essenciais ao controle da diferenciação e da capacidade invasiva das células do CTe (HANNA et al., 2006; HU et al., 2006; MOR; CARDENAS, 2010). Os monócitos e macrófagos representam de 20 a 25% dos leucócitos deciduais, as células dendríticas uterinas (uDC) constituem cerca 1,7% do total e, além disso, pouco se sabe acerca da presença de células B na decídua humana, contudo os linfócitos T em seus subtipos $CD4^+$ e $CD8^+$, representam de 3 a 10% dos leucócitos placentários (PICCINI, 2002; MOR et al., 2011; MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

As funções de linfócitos T de perfil Th17 e de células T reguladoras (Tregs), também devem ser consideradas no curso gestacional (FIGUEIREDO; SCHUMACHER, 2016). A quantidade desregulada de células Th17 esteve relacionada à incidência de abortos espontâneos (NAKASHIMA et al., 2010), o que pode ser explicado por estes linfócitos atuarem na placentação, alterando a proliferação, invasão e morte celular por apoptose das células trofoblásticas (WU et al., 2014). Por outro lado, os linfócitos Tregs surgem como um tipo celular capaz de garantir a tolerância fetal, ao produzirem citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β que atuam no controle da atividade exacerbada de células Th17 e no balanço entre os perfis de mediadores Th1 e Th2 (ALIJOTAS-REIG; LLURBA; GRIS, 2014).

Os aspectos imunológicos característicos da interface materno-fetal, descritos até o momento, reúnem evidências de que o curso adequado da gestação só é possível, graças ao estabelecimento de um delicado balanço entre os perfis Th1 e Th2 de resposta imune, com a predominância de um “*status*” anti-inflamatório que previne a rejeição fetal e, assim, garante o sucesso gestacional. Todavia, como será tratado adiante, este estado imunossupressivo pode aumentar a susceptibilidade do organismo materno a microrganismos causadores de patologias (MOR; CARDENAS, 2010), como *Toxoplasma gondii* (CARLIER et al., 2012), impondo à interface materno-fetal a importante tarefa de controlar disseminação infecciosa e, ao mesmo tempo, de garantir a integridade gestacional.

1.3. Heme oxigenase-1: aspectos funcionais e mecanismos intracelulares associados

O funcionamento adequado das células eucarióticas, em especial nos animais metazoários, é amplamente influenciado por uma molécula orgânica denominada “heme”, a qual se comporta como um grupo prostético na constituição de proteínas essenciais a estes organismos, as hemoproteínas (PONKA, 1999; PAOLI; MARLES-WRIGHT; SMITH, 2002).

A heme é sintetizada nos compartimentos mitocondriais através de sucessivas reações de catálise enzimática, das quais o último passo compreende a inserção de íon ferro, do seu estado ferroso (Fe^{2+}) para o férrico (Fe^{3+}), ao centro do anel de protoporfirina IX que a constitui (PONKA, 1999; FUJIWARA; HARIGAE, 2015). Posteriormente, a heme formada é direcionada aos demais compartimentos celulares e conjugada às diferentes classes de cadeias polipeptídicas, a fim de constituir as hemoproteínas (REDDI; HAMZA, 2016). Esta família de proteínas, por sua vez, possui importantes papéis fisiológicos, sendo componente chave em processos bioquímicos como a fosforilação oxidativa mitocondrial, via o transporte de elétrons, as rotas de detoxificação celular e o controle da expressão gênica, através da modulação das vias de transdução de sinais, sendo também essencial ao transporte e armazenamento de gases pelos tecidos (PONKA, 1999; IMMENSCHUH et al., 2017).

Embora sua síntese e disponibilidade sejam essenciais às células, o excesso de heme livre resulta na geração de um estresse oxidativo celular dependente da produção de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), e devido a isso, a degradação de compartimentos celulares e a perda de suas respectivas funções são consequências reais do perfil pró-oxidante que a heme passa a apresentar (RYTER; ALAM; CHOI, 2006; IMMENSCHUH et al., 2017). Como um mecanismo protetor, as células desenvolveram um sistema enzimático para a degradação da heme em excesso, através da atividade catalítica da enzima heme oxigenase (HO) (OTTERBEIN et al., 2003).

A descoberta e a caracterização funcional de HO se deram nos anos de 1968 e 1969, através dos trabalhos pioneiros de Tenhunen, Marver e Schmid, nos quais a elucidação inicial da atividade desta enzima foi investigada em modelo murino (TENHUNEN; MARVER; SCHMID, 1968; 1969). Desde então, estudos posteriores estabeleceram a existência de três isoformas desta enzima, a HO-1, a HO-2 e a HO-3 (RYTER; ALAM; CHOI, 2006), sendo que destas, a isoforma ativa HO-1 é a única que possui a sua atividade regulada por mecanismos induzíveis, sendo codificada pelo gene *HMOX1* em humanos e expressa preferencialmente em células e tecidos ativos no catabolismo da heme (MAINES; TRAKSHEL; KUTTY, 1986; WILKS et al., 1995; RYTER; ALAM; CHOI, 2006). HO-2, por

sua vez, representa a outra isoforma ativa da enzima, tendo uma expressão constitutiva nas células, ao passo que HO-3 demonstra ser uma isoforma sem atividade funcional catalítica, sendo que os dados acerca de sua expressão gênica foram obtidos, até o momento, apenas por análises em tecidos de rato (MCCOUBREY; EWING; MAINES, 1992; MCCOUBREY; HUANG; MAINES, 1997; HAYASHI et al., 2004; RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Embora HO-1 e HO-2 compartilhem muitas similaridades estruturais e funcionais entre si, ao desempenharem o mesmo papel no catabolismo da heme, os estudos com HO-1 nos mais diferentes aspectos fisiológicos ganharam maior destaque, em virtude do caráter induzível desta isoforma da enzima (RYTER; ALAM; CHOI, 2006; SOARES; BACH, 2009).

A HO-1 é também classificada como uma proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein*) de 32kDa (HSP32) e conforme os primeiros relatos sobre sua localização celular, acreditava-se que esta isoforma se associasse restritamente a fragmentos (microsossomos) de retículo endoplasmático (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Contudo, investigações posteriores demonstraram que, a depender das necessidades celulares, HO-1 pode também se encontrar no núcleo (LIN et al., 2007), em compartimentos mitocondriais (CONVERSO et al., 2006) e ancorada às estruturas caveolares da membrana plasmática (KIM et al., 2004).

Nestes locais, a HO-1 realiza a degradação do excesso de heme, levando à liberação do íon Fe^{2+} , que logo é armazenado por ligação à ferritina, e à formação de quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO) e biliverdina, a qual é subsequentemente convertida em bilirrubina por ação da enzima biliverdina redutase (BVR), dependente do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (RYTER; ALAM; CHOI, 2006; OTTERBEIN; FORESTI; MOTTERLINI, 2016). A reação catalisada por HO-1 requer ainda oxigênio molecular (O_2) e conta com a participação do complexo enzimático citocromo-P450 (CytP450) também acompanhado de NADPH como cofator (TENHUNEN; MARVER; SCHMID, 1968; SOARES; BACH, 2009).

A expressão e a atividade de HO-1 podem ser desencadeadas por situações de hipóxia e por diversas moléculas estimuladoras (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Dentre estas, destacam-se as porfirinas sintéticas, como a hemina, os compostos associados ao estresse oxidativo, variados hormônios e fatores de crescimento, e mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico (NO), o lipopolissacarídeo (LPS), e citocinas como IL-1 β , TNF e IFN- γ (KIM; RYTER; CHOI, 2006; RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Além disso, a expressão e atividade de HO-1 podem ser controladas pela presença contínua de estímulos anti-inflamatórios, como as citocinas IL-10 e TGF- β (LEE; CHAU, 2002; RYTER; ALAM; CHOI, 2006) e os eicosanoides da família das prostaglandinas J₂ (PGJ₂) (LEE; TSAI; CHAU, 2003).

Em condições normais, a maioria destas substâncias induz a expressão gênica de *HMOX1* (HO-1) por meio da ativação de uma classe de proteínas do tipo serina/treonina quinases (Ser/ThrK) pertencentes à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), da qual as três grandes representantes são as isoformas p38-MAPK, a quinase c-Jun N-terminal ativada por estresse (JNK/SAPK) e as quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK1/2) (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Além da via de sinalização das MAPK, outras rotas de transdução de sinais, não menos relevantes, também podem ser recrutadas para a expressão de HO-1, dentre as quais se destacam as vias dependentes de fosfatidilinositol-3-quinase e Akt (PI3K/Akt) e do fator transdutor de sinais e ativador de transcrição (STAT)-3 (RICCHETTI; WILLIAMS; FOXWELL, 2004), bem como as proteínas quinase A, C e G (PKA/C/G) e as famílias de tirosina quinases (TyrK) (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Ao serem preferencialmente ativadas, as MAPK são capazes de fosforilar e induzir a translocação do citosol ao núcleo do fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2), o qual classicamente promove a expressão canônica de HO-1 (RYTER; CHOI, 2016).

Por sua vez, os produtos finais de degradação da heme por HO-1 são tidos como importantes mediadores na proteção celular, sendo que a bilirrubina se comporta como um agente antioxidante e o CO atua no bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF e a proteína inflamatória de macrófagos 1 α e β (MIP-1 α/β), além de ser antiapoptótico, controlando as vias indutoras de morte celular (BROUARD et al., 2000), e capaz induzir à vasodilatação dos grandes vasos sanguíneos, prevenindo assim, a hipóxia (RYTER; CHOI, 2016). Com relação aos mecanismos intracelulares de atuação destes produtos, a bilirrubina recruta a via das MAPK para a geração de seu efeito antioxidante (DENNERY, 2014), já o CO pode atuar na vasodilatação do sistema cardiovascular induzindo à síntese de guanosina monofosfato cíclica (cGMP), via a atividade da guanilato ciclase solúvel (sGC), e exercer suas demais funções citoprotetoras em contextos inflamatórios, através do recrutamento diferencial de vias dependentes da fosforilação dos três tipos de MAPK (IMMENSCHUH; RAMADORI, 2000; KIM; RYTER; CHOI, 2006).

Em virtude dos efeitos benéficos conferidos por seus produtos finais à homeostase celular, HO-1 é considerada um importante marcador anti-inflamatório, com propriedade reguladora dos mecanismos de resposta imunológica, através de sua atuação no balanço dos efeitos gerados pelos mediadores Th1 e Th2 (KAPTURCZAK et al., 2004; XIA et al., 2008). Logo, a expressão e a atividade de HO-1 são importantes fatores a serem considerados no microambiente placentário, ao contribuírem para o estabelecimento da tolerância imunológica materno-fetal, necessária ao sucesso gestacional (OZEN et al., 2015).

1.4. Expressão e atividade de HO-1 na interface materno-fetal

Como abordado anteriormente, o sucesso gestacional só é possível, graças ao estabelecimento de uma tolerância imunológica materna, que permita a aceitação do conceito em desenvolvimento. Com vistas à garantia desta condição, o trofoblasto modula a resposta imune materna (MOR; ALDO; ALVERO, 2017) através de mecanismos em que a participação induzida de HO-1 se faz essencial (BAINBRIDGE; SMITH, 2005; LEVYTSKA et al., 2013; OZEN et al., 2015). Neste sentido, estudos prévios investigaram a expressão das isoformas de HO no microambiente placentário, para melhor compreender suas contribuições durante a gestação em diferentes modelos experimentais.

Kreiser e colaboradores (2003) demonstraram que as expressões proteica e de RNA mensageiro (mRNA) para HO-1 e HO-2 foram significantes na camada de ST dos tecidos placentários de ratas. A presença destas isoformas foi também detectada nos vasos sanguíneos uterinos destas fêmeas, a qual esteve relacionada com uma maior expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), indicando uma contribuição de HO na gestação destes animais (KREISER et al., 2003). Watanabe e colaboradores (2004) evidenciaram que HO-1 é expressa predominantemente no útero, em tecidos extraembrionários e no espongiotrofoblasto da placenta de primeiros períodos gestacionais em camundongos, sugerindo sua participação na placentação destes roedores (WATANABE et al., 2004).

Em modelo humano, importantes estudos elucidaram a expressão e as funções da enzima no contexto gestacional. McLean e colaboradores (2000) demonstraram que as isoformas de HO foram detectadas em placenta humana a termo, sendo que as expressões proteica e de mRNA para HO-2 foram maiores se comparadas as de HO-1. Além disso, HO-2 foi detectada na camada de ST e no endotélio e músculo liso deciduais, locais em que a expressão de HO-1 foi também observada, mas em menor proporção em relação à HO-2 (MCLEAN et al., 2000). Em paralelo, Yoshiki, Kubota e Aso (2000) evidenciaram a presença de HO-2 no endotélio e no músculo liso de vasos sanguíneos de vilos placentários humanos a termo, além de terem sido os pioneiros em demonstrar a expressão de HO-1 no ST e em regiões de CTv de vilos placentários de primeiro e terceiro trimestres, sugerindo que HO-1 possui plasticidade em sua localização na interface materno-fetal humana (YOSHIKI; KUBOTA; ASO, 2000).

Lyall e colaboradores (2000) identificaram a expressão da enzima nos diferentes tipos de trofoblasto humano, dos quais as células de CTv e de CTe apresentaram imunomarcações para ambas as isoformas de HO. Além disso, HO-2 apresentou diferenças de tempo gestacional em sua expressão, fato comprovado por esta enzima ter sido fortemente detectada

na camada de ST de primeiro trimestre, mas reduzida no ST de tecidos a termo, nos quais sua presença foi expressiva por células endoteliais decíduais, mas fraca no endotélio de primeiro trimestre (LYALL et al., 2000). Em contraste, a expressão de HO-1 não se alterou nas placentas de diferentes períodos gestacionais, sendo que sua detecção no trofoblasto se mostrou fraca, possivelmente em virtude de seu caráter induzível (LYALL et al., 2000).

Em complicações gestacionais decorrentes de placentação inadequada, a participação de HO foi também investigada. Barber e colaboradores (2001) verificaram que a expressão endotelial de HO-2 foi reduzida em placentas provenientes de gestações pré-eclâmpticas ou de casos de restrição de crescimento fetal (FGR), quando comparada à mesma expressão em placentas a termo de gestações normais. Estes autores relacionaram ainda a baixa expressão de HO-2 no endotélio placentário, como um possível fator que contribuiu para o estabelecimento destas patologias, uma vez que o CO, enquanto produto proveniente da atividade de HO-1/HO-2, atua como um importante metabólito para o controle do tônus vascular e fluxo sanguíneo placentários (BARBER et al., 2001).

McLaughlin e colaboradores (2003), por outro lado, demonstraram que a atividade do sistema HO, através da avaliação da formação de CO, e a expressão de HO-2, não se alteraram em placentas provenientes de gestações com casos de pré-eclâmpsia leve em comparação com placentas a termo normotensivas, sugerindo que HO-2 seja a responsável pelo catabolismo da heme no microambiente placentário, em ambas as condições (MCLAUGHLIN et al., 2003). Além disso, a expressão de HO-1 nos vilos coriônicos e nas membranas fetais destas placentas pré-eclâmpticas foi maior se comparada a sua expressão em placentas de gestações normais, o que reforça o conhecimento acerca da característica induzível de HO-1, agora também no contexto gestacional (MCLAUGHLIN et al., 2003).

De forma complementar aos trabalhos apresentados, estudos *in vitro* baseados no cultivo de explantes de vilos placentários humanos oriundos de placentas de diferentes trimestres gestacionais, foram também realizados para a investigação do papel das isoformas de HO na fisiologia de células trofoblásticas. Neste sentido, Ahmed e colaboradores (2000) evidenciaram que a expressão de HO-1 foi maior em vilos placentários a termo se comparada à detecção desta isoforma em vilos de primeiro trimestre gestacional, demonstrando que a presença de HO-1 pode progressivamente contribuir com o desenvolvimento adequado da placenta humana. Além disso, a expressão de HO-2 foi predominante nas células endoteliais e estromais vilosas, em comparação com o trofoblasto adjacente (AHMED et al., 2000). Newby e colaboradores (2005) identificaram que em condições normais de disponibilidade de O₂, a expressão de HO-1 é maior no CT em comparação com o ST provenientes de vilos

placentários a termo. Contudo, frente à hipóxia o ST reduziu a expressão de HO-1, como uma provável resposta à baixa tensão de O₂, ao passo que o CT não demonstrou alteração na expressão da enzima (NEWBY et al., 2005).

A participação de HO-1 no contexto gestacional regula os processos de adesão, invasão e implantação do blastocisto à mucosa uterina, além de modular as funções de células locais pertencentes ao sistema imune inato e adaptativo (ZENCLUSSEN et al., 2007; SCHUMACHER et al., 2012; SCHUMACHER; ZENCLUSSEN, 2015).

Em relação aos mecanismos imunológicos que operam no microambiente placentário, HO-1 influenciou na produção de citocinas e de quimiocinas no útero de camundongos gestantes, regulando também a expressão dos receptores para ambas as moléculas em células mieloides uterinas, nas quais a expressão da enzima demonstrou ser predominante em neutrófilos, monócitos e macrófagos (ZHAO et al., 2017). Além disso, a atuação do eixo enzimático HO-1/CO revelou ser importante à garantia da presença e atividade de células uNK, as quais contribuíram no remodelamento das artérias espiraladas em camundongos gestantes (LINZKE et al., 2014).

Schumacher e colaboradores (2012) demonstraram que a inibição farmacológica de HO-1 em camundongos gestantes bloqueou os efeitos protetores desempenhados por linfócitos Tregs, ampliou as taxas de maturação das DCs e promoveu um aumento da atividade de linfócitos T efetores na interface materno-fetal destes animais. Juntos, estes eventos culminaram em uma elevação das taxas de aborto nestas fêmeas, os quais foram revertidos pelo aumento da atividade das células Tregs através do tratamento destes animais com indutor de HO-1, sugerindo que atividade da enzima modula o papel deste tipo de linfócito, visando à garantia da tolerância do conceito pelo organismo materno (SCHUMACHER et al., 2012).

Uma vez em excesso na interface materno-fetal, a heme provoca elevados danos celulares e teciduais, como a indução de necrose, a incidência desregulada de apoptose das células em diferenciação, perdas de funções migratórias e/ou invasivas das populações de trofoblasto, placentação inadequada, desenvolvimento da IUGR e, em casos graves, perda fetal (SCHUMACHER; ZENCLUSSEN, 2015; ZENCLUSSEN et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Logo, as evidências aqui reunidas demonstram a importância da expressão e da atividade de HO-1 na regulação dos mecanismos que garantem a tolerância materno-fetal. Todavia, caso esta condição de equilíbrio imunológico seja alterada em algum elemento chave, o estabelecimento de patologias causadas por agentes infecciosos oportunistas, como *T. gondii* (CARLIER et al., 2012), possui grandes chances de ocorrer.

1.5. *Toxoplasma gondii*: aspectos gerais, características estruturais e ciclo biológico

T. gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, de natureza cosmopolita e capaz de infectar uma gama de hospedeiros, incluindo todos os animais de sangue quente (endotérmicos), como mamíferos e aves (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). *T. gondii* foi descoberto em 1908 por Nicolle e Manceaux na Tunísia (África), ao ser encontrado no roedor *Ctenodactylus gundi*, e no mesmo ano foi identificado por Splendore no Brasil, ao ser detectado no coelho *Oryctolagus cuniculus* (FERGUSON, 2009; DUBEY et al., 2012). Em virtude de sua ampla distribuição, a enfermidade decorrente da infecção por este parasito, designada por toxoplasmose, é considerada uma das zoonoses de maior disseminação global, acometendo pelo menos um terço da população mundial humana (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa, o qual inclui outros microrganismos de importância médica, como *Plasmodium* spp. e *Cryptosporidium* spp. (SOUZA et al., 2010; SULLIVAN; JEFFERS, 2012), apresentando diferentes cepas, a depender de seu espectro de virulência observada em camundongos (HOWE; SIBLEY, 1995). Os isolados do parasito são agrupados em duas amplas divisões: as cepas com genótipos clonais (I, II e III), encontradas especificamente na Europa e América do Norte, e as chamadas cepas “exóticas”, isoladas na América do Sul, como no Brasil (HOWE; SIBLEY, 1995; PENA et al., 2008; LOPES et al., 2016). Em especial, o tipo clonal I de *T. gondii*, como a cepa RH, apresenta altos índices de virulência e mortalidade em modelo murino, sendo que em humanos, é capaz de conduzir aos sinais clínicos da toxoplasmose (HOWE; SIBLEY, 1995; GRIGG et al., 2001). Por outro lado, as cepas do tipo II e III são caracterizadas por sua reduzida virulência e alta capacidade formadora de cistos teciduais, sendo as responsáveis pela maioria dos casos de incidência desta doença (HOWE; SIBLEY, 1995; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

Morfologicamente, o parasito se constitui de uma célula polarizada e alongada, com suas regiões anterior e posterior, afilada e arredondada, respectivamente, sendo sustentado por um citoesqueleto de microtúbulos que garante sua motilidade e estabilidade estruturais (SOUZA et al., 2010; MORRISSETTE, 2015). De modo geral, o parasito se assemelha às células eucarióticas típicas, apresentando, contudo, algumas estruturas também peculiares aos demais representantes do filo, como o apicoplasto, uma organela membranosa na qual ocorrem importantes processos bioquímicos vinculados à sobrevivência de *T. gondii* (MCFADDEN, 2014; MCFADDEN; YEH, 2017). O parasito também possui em sua extremidade anterior, o

conoide ou complexo apical, uma estrutura composta de elementos de citoesqueleto associada a organelas secretoras vesiculares (SOUZA et al., 2010). Precisamente, estas vesículas são nomeadas como micronemas e roptrias, as quais conjuntamente aos grânulos densos citoplasmáticos liberam progressivamente seus conteúdos proteicos armazenados, desencadeando as cascatas moleculares que conduzem aos eventos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira (BOOTHROYD et al., 1998; DUBREMETZ, 1998).

As micronemas liberam proteínas (MICs) que permitem uma interação inicial entre os antígenos de superfície (SAGs) de *T. gondii* e os receptores de membrana plasmática da célula hospedeira, possibilitando uma adesão superficial pelo parasito (BOOTHROYD et al., 1998; GUBBELS; DURAISINGH, 2012). Por sua vez, o conteúdo proteico liberado pelas roptrias (ROPs) do patógeno, coordena seus mecanismos de invasão e atua na formação do vacúolo parasitóforo para seu estabelecimento intracelular, ao passo que as proteínas secretadas pelos grânulos densos (GRAs) se aderem aos limites citoplasmáticos deste vacúolo, estabilizando-o, impedindo a sua fusão aos lisossomos e conferindo a *T. gondii*, a habilidade de se evadir dos mecanismos protetores da célula hospedeira (MORDUE et al., 1999; SOUZA et al., 2010). Além disso, os processos de adesão e invasão desempenhados pelo parasito são mediados por um fenômeno de motilidade celular denominado “*gliding*”, sendo que estes eventos ocorrem de forma rápida e ativa, isto é, sem a dependência direta da maquinaria da célula hospedeira (SOLDATI; MEISSNER, 2004; HEINTZELMAN, 2015; TARDIEUX; BAUM, 2016).

Durante o seu ciclo vital, *T. gondii* se apresenta em três formas infectantes típicas: os taquizoítas, os bradizoítas e os esporozoítas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). O taquizoíta (do grego *tachys* = rápido) é caracterizado por sua elevada taxa de replicação no interior de diferentes tipos de células nucleadas, disseminando-se rapidamente pelo hospedeiro e demarcando a fase aguda da infecção (HUNTER; SIBLEY, 2012; HALONEN; WEISS, 2013). O bradizoíta (do grego *bradys* = lento) representa a forma de multiplicação lenta do parasito, alojando-se no interior de cistos localizados em diferentes órgãos e tecidos, como cérebro, retina e músculos (SULLIVAN; JEFFERS, 2012; SWIERZY et al., 2014). Já o esporozoíta (do grego *sporos* = semente) está contido no interior de oocistos, estruturas capazes de contaminar água e alimentos, quando esporulados, e eliminados juntos às fezes dos felídeos, os hospedeiros definitivos do parasito (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

T. gondii apresenta um ciclo de vida heteroxeno compreendido em duas fases: a etapa sexuada, que se processa no hospedeiro definitivo felídeo, sendo o gato doméstico o alvo mais frequente, e a etapa assexuada, que se desenvolve nos demais animais hospedeiros intermediários, incluindo o homem (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTROYA;

LIESENFELD, 2004). Os felídeos se infectam ao ingerirem, durante a alimentação, as estruturas císticas infectantes, as quais sofrem a ação de enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal e liberam os parasitos ali armazenados (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Por sua vez, os bradizoítas livres penetram ativamente nas células epiteliais intestinais, multiplicando-se por endodiogenia (divisão assexuada) e, logo após, por merogonia, para a geração dos merozoítas, os quais se replicam acentuadamente, invadem novas células e, após sofrerem maturação sexual, formam os gametas masculinos (biflagelados e móveis) e os gametas femininos (imóveis) (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). A fusão entre os gametas na mucosa intestinal do felídeo conduz à formação do oocisto diploide que, ao ser eliminado junto à defecação do animal, sofre divisão celular meiótica (esporogonia) para o desenvolvimento dos esporozoítas (esporulação), os quais só adquirem capacidade infectiva no ambiente externo, sob condições de umidade, temperatura e luminosidade adequadas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Em continuidade ao ciclo, os hospedeiros intermediários podem se infectar por *T. gondii* de diferentes maneiras: ao ingerirem água e/ou alimentos contaminados com oocistos, carne crua contendo cistos, ou pelo contato direto com as formas taquizoítas (JONES; DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Nestes casos citados, ao serem contraídas pelo hospedeiro todas estas formas infectantes se convertem ao estágio de taquizoítas, os quais invadem variados tipos celulares e se multiplicam rapidamente por endodiogenia no interior de seu vacúolo parasitóforo formado, estabelecendo o chamado ciclo lítico de *T. gondii* (BLADER; SAEIJ, 2009; BLADER et al., 2015).

À medida que são gerados, os taquizoítas livres se disseminam pelo organismo hospedeiro, através de fluidos corporais como linfa e sangue, e como consequência, há o estabelecimento das primeiras manifestações clínicas da doença, demarcando a fase aguda da infecção (CENCI-GOGA et al., 2011; SCHLÜTER et al., 2014). Em decorrência da pressão exercida pela resposta imune do hospedeiro, os taquizoítas reduzem sua intensidade de replicação lítica e se diferenciam em bradizoítas, caracterizando a fase crônica da doença, na qual os cistos gerados podem persistir durante anos nos tecidos do organismo animal, evadindo-se dos mecanismos de resistência imunológica, sem ativar respostas inflamatórias exacerbadas (KIM; WEISS, 2008; HALONEN; WEISS, 2013). Devido as suas habilidades desenvolvidas para modular as atividades bioquímicas e fisiológicas do hospedeiro a seu favor (BLADER; SAEIJ, 2009; LÜDER et al., 2009), *T. gondii* adquiriu grande capacidade de disseminação e há vários anos é considerado como um patógeno de importante sucesso evolutivo, em escala global (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.6. Mecanismos de resposta imune do hospedeiro à infecção por *T. gondii*

Em virtude da natureza intracelular obrigatória do parasito e de sua capacidade de modulação das funções celulares do hospedeiro, a resistência imunológica contra *T. gondii* é coordenada, em amplo espectro, pela resposta imune celular (STURGE; YAROVINSKY, 2014). Neste sentido, células imunes inatas e adaptativas se interagem constantemente, a fim de ativarem mecanismos microbicidas pró-inflamatórios direcionados ao controle da disseminação deste patógeno (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; DENKERS et al., 2004).

A presença de *T. gondii* no organismo e a liberação de proteínas específicas de sua própria estrutura, os chamados fatores de virulência, estimulam o recrutamento das APCs, como os monócitos/macrófagos e as DCs, as quais reconhecem os antígenos do parasito via TLRs específicos e respondem com a produção das citocinas inflamatórias IL-12 e TNF (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; DUNAY; SIBLEY, 2010; SANECKA; FRICKEL, 2012; HU; WEI; KORNER, 2017). Juntos, estes mediadores agem sobre células NK e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, estimulando-os a secretarem IFN- γ , tido como o principal mediador de resistência à disseminação de *T. gondii* (YAP; SHER, 1999).

A presença de IFN- γ durante a fase aguda da infecção, atuando via a ativação de STAT-1, sustenta este microambiente pró-inflamatório contra o parasito, modulando a expressão das cadeias proteicas constituintes de MHC-I e II nas APCs, induzindo a diferenciação das células TCD4⁺ ao perfil Th1 e potencializando a atividade citotóxica exercida por células TCD8⁺ (MILLER et al., 2009; YAROVINSKY, 2014). A produção contínua de IFN- γ , mantida por estas células da imunidade inata e adaptativa, induz a um “*feedback*” de ativação em macrófagos e em células NK, bem como também em células não hematopoiéticas, de importantes mecanismos vinculados à eliminação de *T. gondii* (YAP; SHER, 1999; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Algumas destas ações microbicidas compreendem a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) (STURGE; YAROVINSKY, 2014), a produção de óxido nítrico (NO) pela sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997; MILLER et al., 2009) e a degradação e conversão metabólica do triptofano, aminoácido importante à sobrevivência do parasito, por ação da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (PFEFFERKORN, 1984; PFEFFERKORN; REBHUN; ECKEL, 1986; GUPTA et al., 1994; SILVA et al., 2002). Além disso, a disponibilidade intracelular de ferro também é considerada como um fator limitante à replicação do patógeno, presente em enterócitos, por exemplo, que exercem o

primeiro contato com *T. gondii*, durante a via de infecção oral (DIMIER; BOUT, 1997; BOUT et al., 1999; DIMIER; BOUT, 1998).

Embora o controle da disseminação do parasito seja mediado essencialmente pelo padrão de resposta imune pró-inflamatória, a existência de atividades protetoras que amenizem os efeitos gerados pelos mecanismos microbicidas citados, mostra-se essencial à garantia da integridade celular e tecidual do hospedeiro (ALIBERTI, 2005). Neste sentido, a articulação entre citocinas com papel regulador, como IL-4, IL-10 e TGF- β , e a presença de mediadores metabolicamente ativos, como o eicosanoide lipoxina A₄ (LXA₄), desempenham ações anti-inflamatórias capazes de controlar a produção e as funções de IL-12 e IFN- γ contra *T. gondii*, prevenindo assim, a geração de uma resposta inflamatória exacerbada e danosa ao hospedeiro (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; ALIBERTI et al., 2002; ALIBERTI, 2005).

Além dos mediadores citados, outras substâncias atuantes na resposta imune celular, como o MIF, exercem papel na resistência do hospedeiro à infecção pelo parasito, sendo que esta citocina demonstrou participar da maturação de DCs e atuar na produção de IL-1 β , IL-12 e TNF, em camundongos infectados por *T. gondii* (FLORES et al., 2008; TERRAZAS et al., 2010). IL-6, por sua vez, mostrou-se como um mediador de produção elevada por monócitos humanos, quando estes foram estimulados com soros positivos para a infecção, contendo IgG anti-*T. gondii* (PELLOUX et al., 1994). Além disso, IL-8, enquanto quimiocina reguladora do recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos aos sítios inflamatórios, teve sua produção aumentada, através do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B), em células epiteliais uterinas humanas (HeLa), sugerindo também sua contribuição na patogênese da infecção (KIM et al., 2001).

A resposta imunológica contra *T. gondii* pode ser, portanto, compreendida como um conjunto de fenômenos e interações celulares, através dos quais o hospedeiro visa minimizar os efeitos deletérios gerados pela infecção, mas ao mesmo tempo, garantir a sua integridade estrutural (ALIBERTI, 2005; HUNTER; SIBLEY, 2012). Apesar de importantes ações celulares contribuírem para a eliminação do parasito em suas diferentes fases de infecção, *T. gondii* desenvolveu sofisticados mecanismos evasivos, sendo capaz de subverter a resposta imune que lhe é imposta, com vistas à sua disseminação (HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017).

Estudos prévios demonstraram que, em resposta à infecção, vias de transdução de sinais intracelulares do hospedeiro são passíveis de serem alteradas, como ocorrido com as dependentes das proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS)-1, 2 e 3, as quais são requeridas para a manutenção de um perfil anti-inflamatório, importante à viabilidade de *T. gondii* (MACHADO et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2006; WHITMARSH et al.,

2011). Além disso, os próprios fatores de virulência secretados pelo parasito, durante seus processos de adesão e invasão celulares, mostram-se capazes de modular a resposta imune a seu favor (HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017). ROP16, por exemplo, é capaz de induzir à fosforilação de STAT-3 e STAT-6 para a regulação positiva de genes, no hospedeiro, marcadores de um perfil imune Th2 que favorece o progresso da infecção, em detrimento à expressão dos fatores Th1 de caráter protetor (SAEIJ et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2009; ONG; REESE; BOOTHROYD, 2010).

Em adição, *T. gondii* também é capaz modular a ativação de vias de sinalização intracelulares multifuncionais, como as dependentes do fator NFκB e da fosforilação das MAPK, as quais regulam a expressão de fatores pró-inflamatórios, essenciais ao controle do parasito pelo hospedeiro (DENKERS et al., 2004).

Especialmente, a via das MAPK possui intrínseca relação com os processos de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*, uma vez que, durante os estágios iniciais da infecção, o recrutamento e ativação das quinases p38-MAPK, JNK e ERK1/2 foram verificados em diferentes modelos celulares, como macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) (KIM et al., 2005), neutrófilos murinos (SUKHUMAVASI; EGAN; DENKERS, 2007), monócitos humanos (células THP-1) (VALÈRE et al., 2003), linfócitos T humanos (células Jurkat) (ISMAIL et al., 2017), células HeLa (KIM et al., 2006) e células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) (BARBOSA et al., 2014). De forma interessante, após serem ativadas, estas três MAPKs apresentaram uma progressiva desfosforilação com o decorrer do tempo de infecção, a qual esteve associada a uma redução na secreção de IL-12 e TNF por macrófagos murinos, sugerindo mecanismos evasão da resposta imune, utilizados por *T. gondii* (KIM; BUTCHER; DENKERS, 2004).

A resposta imunológica contra *T. gondii* é considerada complexa, a partir do momento em que requer a atuação de sofisticados eventos celulares que proporcionam à garantia do equilíbrio entre os mecanismos efetores pró (Th1) e anti-inflamatórios (Th2), capazes de determinar o progresso ou o controle da infecção, e ao mesmo tempo, proteger a integridade fisiológica do hospedeiro (GAZZINELLI et al., 2014; BRASIL et al., 2017; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018). Embora estas ações de resistência imune a *T. gondii* demonstrem eficácia em indivíduos imunocompetentes, mesmo com as rotas de evasão celular utilizadas pelo parasito, as ações de combate à infecção se mostram debilitadas em indivíduos imunossuprimidos e em gestantes, enquadrando-os como grupos de risco para a incidência da toxoplasmose (MONTROYA; LISENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; BLADER; SAEIJ, 2009; DARD et al., 2016; POMARES; MONTROYA, 2016).

1.7. Toxoplasmose congênita e *T. gondii* na interface materno-fetal

O estabelecimento da infecção por *T. gondii*, em associação aos efeitos fisiopatológicos gerados pela resistência imunológica do hospedeiro, desencadeiam a toxoplasmose, uma doença que, em humanos, é mais grave em imunocomprometidos e mulheres em período gestacional (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DARD et al., 2016). Embora sejam assintomáticos, os indivíduos imunocompetentes podem apresentar sintomas não específicos associados à infecção primária, como febre, linfadenopatias, dores de cabeça (cefaleias) e musculares (SAADATNIA; GOLKAR, 2012; CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014).

Em decorrência do sucesso evolutivo alcançado pelo parasito, a toxoplasmose possui ampla incidência global e apresenta distintos perfis epidemiológicos conforme as regiões e países considerados (SUKTHANA, 2006; PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). No Brasil, como exemplo, a soroprevalência da doença se apresenta com índices elevados, os quais variam em função das condições de saúde, sanitárias, culturais e socioeconômicas da população (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DUBEY et al., 2012; SEPÚLVEDA-ARIAS et al., 2014). Sendo assim, os humanos podem adquirir e desenvolver a toxoplasmose ao consumirem água e alimentos contaminados com oocistos ou cistos, ou ao serem expostos diretamente aos taquizoítas de *T. gondii*, através de acidentes laboratoriais, pelo transplante de órgãos ou sangue contaminados ou pela transmissão vertical durante a gestação (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ELMORE et al., 2010). Taquizoítas, quando presente no organismo materno, podem migrar à interface materno-fetal e, neste local, são capazes de atravessar a barreira placentária e infectar os tecidos embrionários/fetais, caracterizando o estabelecimento da forma congênita da doença (POMARES; MONTROYA, 2016).

A toxoplasmose congênita, portanto, compreende a fisiopatologia gerada pela transmissão transplacentária de *T. gondii*, decorrente de uma aquisição materna primária da doença, previamente ou durante a gestação, ou gerada por reativações da fase crônica da infecção durante o progresso gestacional (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011; MCAULEY, 2014; OZ, 2014; POMARES; MONTROYA, 2016). Como consequências, a enfermidade pode levar ao desenvolvimento de sequelas no concepto, como hidrocefalia, microencefalia e distúrbios neurológicos, além da ocorrência de calcificações intracranianas, de anemia associada à trombocitopenia, de lesões visuais, como retinocoroidite e estrabismo, e, em casos graves, pode conduzir ao óbito fetal (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014). Embora estas resultantes patológicas sejam passíveis de ocorrer, seus níveis

de acometimento ao embrião/feto variam em função dos trimestres gestacionais e conforme as taxas de transmissão vertical do parasito (MCAULEY, 2014).

Assim, no início da gestação as chances de infecção congênita são reduzidas, tendendo a aumentar com o progresso dos trimestres gestacionais, ao passo que o surgimento das sequelas patológicas possui caráter inverso, sendo que infecções de primeiro trimestre podem levar a abortos espontâneos, e as de terceiro terço gestacional apresentam resultantes clínicas brandas ou inexistentes ao feto (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014).

Embora importantes dados acerca do desenvolvimento da toxoplasmose congênita, reúnam esforços para elucidar as razões da susceptibilidade diferencial ao parasito, acredita-se que as variações temporais de transmissão materno-fetal de *T. gondii* estejam associadas aos típicos eventos polarizadores da reposta imune (Th1/Th2) materna (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001) e às mudanças dos aspectos morfológicos inerentes à estrutura placentária (FERRO et al., 1999; ABBASI et al., 2003). Neste sentido, análises *in vitro*, baseadas no cultivo de tecidos e células trofoblásticas, e investigações com modelos animais, nos quais há importantes variações no perfil de susceptibilidade ao parasito, são amplamente desenvolvidas com o intuito de se melhor compreender os aspectos imunológicos e os efeitos congênitos característicos da doença (ABOU-BACAR et al., 2004; BARBOSA et al., 2008; FERRO et al., 2008; GOMES et al., 2011; COUTINHO et al., 2012; FRANCO et al., 2015).

A placenta, enquanto unidade constituinte da interface materno-fetal, empenha-se em prevenir a transmissão vertical de *T. gondii* e, ao mesmo tempo, garantir a integridade estrutural do concepto em desenvolvimento (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011; ROBBINS et al., 2012). Neste cenário, ao produzirem níveis regulados de mediadores pró e anti-inflamatórios, as populações de trofoblasto são capazes de modular as funções de células imunes, como monócitos (CASTRO et al., 2013), macrófagos (GUIRELLI et al., 2015) e células NK (LIU et al., 2013; HAN et al., 2014), na tentativa de controlarem os índices de disseminação de *T. gondii* e, ao mesmo tempo, minimizarem os efeitos decorrentes da infecção, que impõem riscos ao sucesso gestacional (CARLIER et al., 2012).

Embora existam medidas farmacológicas clássicas e alternativas para a redução da infecção de células trofoblásticas por *T. gondii* (FRANCO et al., 2011; SILVA et al., 2017), com vistas a melhores profilaxias e/ou resoluções da toxoplasmose congênita, o desenvolvimento de estudos para a geração de novas possibilidades de intervenções terapêuticas, faz-se necessário (OZ, 2014; POMARES; MONTROYA, 2016; VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, 2016).

1.8. Linhagens celulares como modelos de trofoblasto humano

A fim de se melhor compreender a biologia do trofoblasto, estudos *in vitro* são realizados com uso de células trofoblásticas estabelecidas em cultura, como as células trofoblásticas vilosas humanas da linhagem BeWo (PATTILLO; GEY, 1968), e as extravilosas humanas, pertencentes à linhagem HTR-8/SVneo (GRAHAM et al., 1993).

As células da linhagem BeWo, isoladas de um coriocarcinoma humano por Pattillo e Gey (1968) há exatos 50 anos, apresentam características morfológicas e funcionais bastante similares às de células do citotrofoblasto viloso humano normal (PATTILLO; GEY, 1968; PATTILLO et al., 1979). Quando em cultura, células BeWo produzem importantes citocinas mediadoras da resposta imune, como IL-4 (MORAES-PINTO et al., 1997), IL-6, IL-8 (FUJISAWA et al., 2000) e MIF (CASTRO et al., 2013), além de hormônios placentários como o estrógeno (PATTILLO et al., 1972), a progesterona (BAHN et al., 1981) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (PATTILLO et al., 1979; BÜTZOW, 1982).

Já a linhagem de células HTR-8/SVneo foi estabelecida há pouco mais de 20 anos por Graham e colaboradores (1993), pela transfecção de células parentais provenientes do citotrofoblasto extraviloso humano, através da inserção em seu genoma de um plasmídeo contendo o gene do antígeno T (Tag) do vírus símio 40 (SV40). Desta maneira, após sofrerem esta manipulação genética, as células transfectadas adquiriram a capacidade de se proliferarem indefinidamente, dando origem a esta linhagem que mantém importantes características fenotípicas e funcionais do trofoblasto extraviloso humano típico (GRAHAM et al., 1993). Além disso, células HTR-8/SVneo também secretam hCG, possuem grande capacidade de crescimento, proliferação e invasão (GRAHAM et al., 1993), além de serem responsivas a citocinas que influenciam tais processos, tais como IL-6 (JOVANOVIĆ; VÍCOVAC, 2009), IL-8 (JOVANOVIĆ et al., 2010) e MIF (KRIVOKUĆA et al., 2015).

Estudos com células BeWo e HTR-8/SVneo têm sido amplamente realizados para o melhor entendimento das funções de HO-1 na citofisiologia da placenta e dos trofoblastos humanos. Em uma investigação anterior, foi demonstrado em células BeWo e HTR-8/SVneo, que HO-1 se comporta como um fator de regulação negativa da motilidade migratória do citotrofoblasto humano, por meio da participação do receptor nuclear ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR)- γ (BILBAN et al., 2009). Além disso, na presença de VEGF, células BeWo elevaram a expressão de HO-1 e a liberação de CO, por meio da ativação do fator de transcrição Nrf-2 dependente fosforilação da MAPK do tipo ERK1/2 (KWEIDER et al., 2011). Também foi verificado que a indução farmacológica de Nrf-2 gerou um aumento nos

níveis de mRNA para HO-1 em células HTR-8/SVneo (LI et al., 2016), e que a inibição da enzima pela protoporfirina IX de zinco II (ZnPP), através de mecanismos competitivos com a heme, reduziu de forma significativa os processos de proliferação e invasão, também em células HTR-8/SVneo (HA et al., 2015).

Frente à infecção por *T. gondii*, células BeWo e HTR-8/SVneo se comportam como modelos relevantes ao estudo dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade diferencial do trofoblasto humano ao parasito. Estudos demonstraram que estas linhagens são permissivas à disseminação deste patógeno (PFAFF et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; GUIRELLI et al., 2015) e são capazes de modular a atividade funcional de células imunes inerentes ao microambiente placentário, em modelo de infecção experimental por *T. gondii* (CASTRO et al., 2013; GUIRELLI et al., 2015). Uma vez que células trofoblásticas se diferenciam em distintas populações para realização de importantes atividades estruturais e funcionais no microambiente placentário, elucidar dos papéis de HO-1 nestas linhagens celulares demonstra ser essencial ao estabelecimento da funcionalidade deste sistema enzimático no contexto do fisiológico do trofoblasto humano, especialmente, em infecção por *T. gondii*.

1.9. Participação de HO-1 na imunopatologia de doenças infecciosas

Os dados apresentados nas sessões anteriores definiram importantes aspectos biológicos, nos quais a expressão e a atividade citoprotetora de HO-1 estiveram associadas à fisiologia celular adequada e à homeostase imunológica do microambiente placentário. Neste sentido, os mecanismos vinculados às ações imunes desencadeadas por HO-1 devem ser considerados, para a melhor compreensão das funções desta enzima em respostas associadas às doenças infecciosas (XIA et al., 2008; RIQUELME et al., 2016).

Com base em estudos anteriores, a expressão e a atividade funcional de HO-1 demonstraram influenciar na ocorrência das fases inata e adaptiva da resposta imunológica, ao regular a expressão de TLRs específicos e interferirem nas vias endossômicas/lisossômicas de síntese e processamento das cadeias de MHC-II e I, controlando assim, a apresentação antigênica excessiva desempenhada pelas APCs, às células TCD4⁺ e TCD8⁺, respectivamente (HULL; AGARWAL; GEORGE, 2014; RIQUELME et al., 2016). Além disso, os produtos finais resultantes do catabolismo da heme pela atividade de HO-1, o CO e a bilirrubina, demonstraram importantes habilidades em reduzir a maturação excessiva das DCs e favorecer a diferenciação dos linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺) (CHAUVEAU et al., 2005; CHOI et al., 2005; XIA et al., 2008). Por meio destas ações, HO-1 é capaz de regular os eventos que levam

à ativação dos perfis efetores de células T (Th1, Th2 e Th17), apresentando-se como um componente celular que leva a um estado de imunotolerância protetor ao organismo (MCDAID et al., 2005; XIA et al., 2008; NIKOLIC et al., 2014).

Em razão de sua capacidade em proporcionar um microambiente de supressão imune, a depender do contexto em que está inserida, a atividade de HO-1 apresenta papéis essenciais na modulação do perfil de citocinas secretadas por células linfoides e mieloides, e na regulação da polarização pró (M1) ou anti-inflamatória (M2) de macrófagos (NAITO; TAKAGI; HIGASHIMURA, 2014). Neste cenário, HO-1 é conhecida por induzir a síntese e secreção de citocinas anti-inflamatórias, controlar e reduzir a produção daquelas de perfil pró-inflamatório e, por conseguinte, mostra-se hábil em ativar os mecanismos que induzem ao perfil M2 de macrófagos, em detrimento ao fenótipo M1, nos mais variados contextos de resposta inflamatória (WEIS et al., 2009; SIERRA-FILARDI et al., 2010; HULL; AGARWAL; GEORGE, 2014; NAITO; TAKAGI; HIGASHIMURA, 2014).

Somadas aos aspectos apresentados, a expressão e a atividade funcional de HO-1 demonstraram envolvimento com a resistência imunológica de diferentes modelos experimentais, a infecções causadas por microrganismos de caráter patogênico, tais como: *Mycobacterium tuberculosis* (COSTA et al., 2016; ROCKWOOD et al., 2017), *Listeria monocytogenes* (WANG et al., 2017), *Trypanosoma cruzi* (PAIVA et al., 2012), *Leishmania* spp. (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005; LUZ et al., 2012; QUINTELA-CARVALHO et al., 2017) e *Plasmodium* spp. (PAMPLONA et al., 2007; EPIPHANIO et al., 2008; SEIXAS et al., 2009; CUNNINGTON et al., 2012; JENEY et al., 2014). Além de participar dos mecanismos de resposta aos patógenos supracitados, influenciando de forma positiva ou negativa no controle do crescimento e replicação dos mesmos, HO-1 esteve também envolvida com a resposta imune frente à infecção por *T. gondii* (ARAÚJO et al., 2013).

Araújo e colaboradores (2013) demonstraram que a indução da atividade de HO-1, pelo tratamento com hemina, exerceu um controle da infecção por *T. gondii* no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c e, em especial, no intestino delgado de animais C57BL/6, sendo este o modelo murino portador do “background” de susceptibilidade à infecção pelo parasito (ARAÚJO et al., 2013). De forma complementar, este mesmo tratamento com hemina capaz de controlar o parasitismo, foi também eficaz em aumentar a expressão proteica intestinal deIDO em animais C57BL/6 infectados, sugerindo que, em infecção experimental por *T. gondii*, a indução da atividade de HO-1 é capaz de controlar a replicação do parasito através de mecanismos dependentes da participação deIDO (ARAÚJO et al., 2013).

Levando-se em consideração o papel protetor de HO-1 no contexto materno-fetal, outros importantes estudos demonstraram relações da expressão e atividade desta enzima com infecções gestacionais, causadas por outros patógenos que podem ser transmitidos verticalmente ao conceito. Nesse sentido, o aborto induzido pela infecção de camundongos gestantes por *Brucella abortus*, esteve vinculado a uma redução da expressão de HO-1 na placenta destes animais, sendo que a supressão por “*knockdown*” de HO-1 em células trofoblásticas gigantes (TG), advindas da interface materno-fetal destas fêmeas, relacionou-se a aumentos nos índices de morte celular induzida por *B. abortus* (TACHIBANA et al., 2008). Posteriormente, Tachibana e colaboradores (2011) também demonstraram que a infecção de células TG por *L. monocytogenes* reduziu a expressão de HO-1 e da proteína anti-apoptótica Bcl-XL, culminando em maiores índices de morte celular destas células e de aborto induzido em fêmeas de camundongos gestantes (TACHIBANA et al., 2011).

Posteriormente, Hashino e colaboradores (2015) demonstraram que a mesma infecção por *L. monocytogenes* capaz de reduzir a expressão de HO-1 em células TG, induziu à desfosforilação de p38-MAPK, JNK e ERK1/2, sendo que a inibição desta desfosforilação das MAPK levou uma recuperação da expressão de HO-1 e bloqueou a morte celular induzida pela infecção. Todavia, neste estudo, a eficiência infecciosa de *L. monocytogenes* só se fez possível quando esta bactéria, por mecanismos próprios, foi a responsável pelos efeitos de desfosforilação das quinases, fato este comprovado pelo uso de inibidores das MAPK e de fosfatases da célula hospedeira (HASHINO et al., 2015). Além disso, os autores verificaram ainda que, apesar de as três quinases serem alvos de desativação por *L. monocytogenes*, apenas JNK e ERK1/2, quando bloqueadas, estiveram relacionadas a uma redução na expressão de HO-1, demonstrando a importância destes dois componentes de sinalização intracelular, tanto na expressão da enzima pelo trofoblasto murino, quanto em infecções congênitas, como neste modelo *in vitro* (HASHINO et al., 2015).

Essencialmente, os estudos supracitados analisaram a participação funcional de HO-1 nos mecanismos de resposta imune a importantes patógenos, em diferentes contextos biológicos. Entretanto, poucos foram os trabalhos que buscaram investigar os mecanismos intracelulares, através dos quais, HO-1 é potencialmente capaz de interferir na disseminação de *T. gondii*, especialmente na interface materno-fetal. Logo, no microambiente representado pelo trofoblasto, evidências anteriores comprovam que o parasito possui grandes habilidades de se evadir dos mecanismos intracelulares de controle da infecção, reforçando a necessidade de novas investigações que visem elucidar uma possível participação de HO-1 no controle da infecção congênita por *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA

A expressão e a atividade funcional de HO-1 são elementos fundamentais à homeostase celular, ao promoverem a geração de um microambiente citoprotetor, nas mais variadas circunstâncias fisiopatológicas às quais os organismos vivos estão expostos. No contexto da interação materno-fetal, o trofoblasto representa uma população celular de origem embrionária/fetal capaz de se diferenciar em importantes subpopulações, das quais as células trofoblásticas vilosas e extravilosas, na espécie humana, desempenham papéis cruciais para garantir o sucesso gestacional, regulando os eventos que regem a placentação correta e favorecendo o estabelecimento de uma tolerância imunológica materna, essencial à aceitação do conceito em desenvolvimento. Ao também possuir sua expressão e atividade presentes nestas populações celulares, HO-1 atua benéficamente no trofoblasto e contribui para a geração de um perfil imunológico anti-inflamatório (Th2) que favorece a homeostase do microambiente gestacional. Por outro lado, estas mesmas células que se mostram essenciais ao estabelecimento do diálogo materno-fetal, comportam-se como alvos de infecção por *T. gondii*, o qual se utiliza destas para se disseminar pelo microambiente placentário, sendo capaz de driblar seu equilíbrio imune e atingir, por fim, o conceito em desenvolvimento, resultando no desenvolvimento da toxoplasmose congênita.

O controle da toxoplasmose pelo hospedeiro está associado a um padrão de resposta imune tipicamente pró-inflamatório (Th1), o qual é incompatível e prejudicial à gestação quando em excesso. Além disso, estudos anteriores verificaram que a atividade de HO-1 esteve associada com a proteção do trofoblasto frente a infecções bacterianas (TACHIBANA et al., 2008; 2011; HASHINO et al., 2015) e com o controle da infecção aguda sistêmica por *T. gondii* (ARAUJO et al., 2013), ambos em modelo de infecção murina experimental.

Uma vez que HO-1 demonstra importância à fisiologia do trofoblasto humano, assim como também está associada às infecções causadas por patógenos oportunistas, como *T. gondii*, é plausível supor que a expressão e a atividade desta enzima possam atuar em uma possível modulação da infecção de células trofoblásticas vilosas e extravilosas humanas por este parasito, através de prováveis mecanismos intracelulares associados à HO-1 e à infecção, como a via de sinalização das MAPK. Logo, o presente trabalho justifica a sua realização por contribuir como novos dados para a elucidação do possível papel de HO-1 na transmissão vertical de *T. gondii*, com vistas ao estabelecimento de novas medidas alternativas para a prevenção e/ou tratamento da patologia congênita gerada por este parasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a participação da heme oxigenase-1 (HO-1), bem como de possíveis mecanismos intracelulares associados, na infecção de células trofoblásticas vilosas (linhagem BeWo) e extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) humanas por *Toxoplasma gondii*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito dos tratamentos com hemina, fármaco indutor de HO-1, na viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo;
- Avaliar a influência do tratamento com hemina sobre o índice de proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo;
- Detectar e quantificar a expressão de HO-1 em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii* e tratadas, ou não, com hemina;
- Detectar e quantificar a expressão das formas fosforiladas/ativas das proteínas pertencentes à via de sinalização das MAPK (*p*-p38, *p*-JNK e *p*-ERK1/2) em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii* e tratadas, ou não, com hemina;
- Mensurar a atividade funcional de HO-1 através da quantificação do conteúdo intracelular total de heme, bem como de bilirrubina secretada, por células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii* e tratadas, ou não, com hemina;
- Quantificar os níveis de secreção das citocinas MIF, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF por células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii* e tratadas, ou não, com hemina;
- Quantificar a produção de óxido nítrico (NO), por dosagem de nitrito, em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii* e tratadas, ou não, com hemina;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura e manutenção de células BeWo, HTR-8/SVneo e HeLa

As células trofoblásticas da linhagem BeWo, adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA), e as células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo, adquiridas da Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP), foram cedidas pela Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Neste estudo, células BeWo e HTR-8/SVneo foram utilizadas como modelos de citotrofoblasto viloso e extraviloso humanos, respectivamente. Além disso, as células da linhagem HeLa (epiteliais de adenocarcinoma de cérvix uterino humano) (ATCC) foram também utilizadas neste trabalho, para a manutenção do clone 2F1 (cepa RH) de *T. gondii*. Todas as linhagens celulares foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM/UFU) sendo que, de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta instituição (CEP/UFU) através do comunicado N°13/2012, projetos de pesquisa científica que envolvam a utilização de linhagens celulares adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética por este comitê de regulamentação (ANEXO).

As células foram cultivadas, separadamente, em frascos de cultivo de 25 ou de 75cm² (Nunc™ Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca ou Falcon™ BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) contendo meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), além de tampão HEPES a 0,01M, bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 0,024M, L-glutamina a 0,002M e antibióticos (penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100µg/mL) (todos os reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (condições de cultura) (BARBOSA et al., 2015; GUIRELLI et al., 2015). As linhagens celulares foram mantidas em cultura por passagens seriadas, nas quais o repique celular foi realizado a cada 48 horas aproximadamente. Para tal, o meio de cultura metabolizado por células já confluentes foi retirado dos frascos de cultivo e as células foram incubadas com 400 a 1000µL de solução de tripsina acrescida de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,25% (Sigma-Aldrich), por 5 minutos em estufa de cultivo. Em seguida, as células foram lavadas com meio a 10% de SFB, para a inativação da tripsina, a suspensão celular foi transferida para tubos de 15mL e centrifugada a 176,4 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Feito isso, o sobrenadante foi descartado, o

sedimento celular obtido foi ressuspensão em meio a 10% de SFB e distribuído nos frascos de cultura para a realização dos experimentos. Por fim, uma parcela dos cultivos celulares foi congelada em meio apropriado, constituído SFB a 90% acrescido do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (v/v), com a finalidade de se garantir a manutenção dos estoques das linhagens celulares em nitrogênio líquido (N₂).

4.2. Manutenção *in vitro* do clone 2F1 (cepa RH) de *T. gondii* e infecção experimental

Os taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii*, provenientes da cepa RH do parasito e que expressam o gene da enzima β -galactosidase (SEEBER; BOOTHROYD, 1996), foram cedidos pelo Dr. Vernon B. Carruthers da Universidade de Michigan (EUA), para a realização dos experimentos *in vitro*. A cepa foi mantida por passagens seriadas em monocamadas de células HeLa cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de SFB (GUIRELLI et al., 2015). À medida que a maioria das células se encontrava lisada por ação dos parasitos, os sobrenadantes dos frascos de cultivo contendo os taquizoítas livres foram coletados, transferidos para tubos de 15mL e centrifugados a 176,4 x g durante 5 minutos. Em seguida, os sedimentos de parasitos foram homogeneizados em meio a 2% de SFB e distribuídos em novos frascos de cultivo contendo monocamadas de células HeLa não infectadas, para a garantia do ciclo lítico de *T. gondii*. Em paralelo, assim como realizado para a manutenção dos estoques das linhagens celulares, uma parcela dos cultivos de células HeLa infectadas com estes taquizoítas também foi congelada em nitrogênio líquido (N₂), em alíquotas contendo a solução de SFB a 90% acrescido de DMSO a 10% (v/v).

Para a realização das infecções experimentais, células HeLa confluentes contendo taquizoítas intracelulares foram removidas dos frascos de cultura com o auxílio de *cell scraper* (TPP®, Suíça), coletadas e submetidas à lise celular, por meio de passagens mecânicas em seringas acopladas com agulhas de 21 e 26 gauges, respectivamente. O lisado resultante foi então centrifugado a 19,6 x g por 3 minutos, para a remoção de debris celulares. Posteriormente, o sobrenadante obtido contendo os taquizoítas livres foi coletado, novamente centrifugado, a 176,4 x g por 5 minutos, e o sedimento de parasitos resultante foi ressuspensão em meio a 2% de SFB e, finalmente, utilizado nas infecções experimentais que se seguiram. Este procedimento realizado teve por intuito obter taquizoítas extraídos simultaneamente de suas células hospedeiras, uma vez que apresentariam similares taxas de viabilidade, tornando-os aptos a serem utilizados nos experimentos, se comparados a aqueles parasitos liberados espontaneamente de suas células.

4.3. Tratamentos com Hemina

Para a execução dos experimentos *in vitro*, células BeWo e HTR-8/SVneo foram expostas a estímulos de indução da expressão e atividade de HO-1, por meio de tratamentos com a ferro protoporfirina IX sintética, hemina (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). De maneira simplificada, hemina foi inicialmente preparada em uma solução prévia concentrada a 0,01M, através de sua reconstituição em solução veículo de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1M, diluído a 10% em meio RPMI incompleto (90%) (v/v), isto é, isento de SFB e L-glutamina (VASCONCELLOS et al., 2016). Finalmente, a partir desta solução prévia, as soluções de uso experimental, em suas concentrações específicas, foram preparadas em meio a 10% de SFB para células BeWo e HTR-8/SVneo. Em todos os experimentos que se seguem, os tratamentos com hemina foram realizados, sendo que em paralelo, as linhagens celulares também foram incubadas apenas com solução de NaOH, o qual foi preparado na mesma porcentagem de diluição do NaOH presente na mais alta dose de hemina utilizada em um determinado ensaio realizado. Portanto, NaOH foi a solução controle (veículo) empregada para a solubilização eficaz desta porfirina. Além disso, as soluções prévia e de uso experimental foram manipuladas preferencialmente ao abrigo da luz, com o intuito de se evitar a geração de radicais livres que poderiam ocasionar em uma consequente perda da eficiência de hemina durante os experimentos (VASCONCELLOS et al., 2016).

4.4. Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT

A viabilidade de ambas as linhagens celulares expostas aos tratamentos com hemina, em diferentes concentrações, foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT conforme estabelecido por Mosmann (1983). Para isso, células BeWo (3×10^4 células/200 μ L/poço) e HTR-8/SVneo (1×10^4 células/200 μ L/poço) confluentes foram retiradas dos frascos de cultura, como descrito (item 4.1), quantificadas em câmara de Neubauer, através do método de seleção de células viáveis pelo corante azul de tripan a 0,4%, ajustadas às concentrações estipuladas e cultivadas, separadamente, em placas de 96 poços (Nest Biotech Co., Ltd, Wuxi, China) em meio a 10% de SFB, por 24 horas, e em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, as células foram então tratadas com as doses propostas de hemina, baseadas em trabalhos anteriores, a 10, 40, 80, 100 ou 200 μ M (LIU et al., 2013; LIU; HASSANA; STILES, 2016; JAMAL UDDIN et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2016), ou com NaOH a 0,2% em meio a 10% de SFB, como condição veículo, sendo mantidas em condições de cultura por 24 horas adicionais. Células BeWo e HTR-8/SVneo não tratadas

com hemina ou com veículo e incubadas apenas com meio a 10% de SFB, serviram como condição controle para esta análise de viabilidade celular. Ao final deste período, os sobrenadantes dos poços foram removidos e as células foram incubadas com 10µL do reagente *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) (Sigma-Aldrich) a 5mg/mL, acrescidos de 90µL de meio a 10% de SFB (1:10), permanecendo em estufa por 4 horas adicionais.

Por fim, as placas foram centrifugadas a 176,4 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, os sobrenadantes cuidadosamente removidos e descartados, e os cristais de formazan de coloração violeta produzidos por células BeWo e HTR-8/SVneo viáveis, as quais metabolizaram o reagente de MTT, foram solubilizados pela adição de 100µL/poço de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em N,N-dimetil formamida (DMF) a 50% (p/v). Após homogeneização completa dos cristais, a densidade óptica (DO) das amostras foi determinada em espectrofotômetro de microplacas a 570nm por meio do programa *SoftMax[®] Pro* Versão 6.3 (ambos VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação à condição meio (controle de 100%), em ambas as linhagens celulares. Para a obtenção dos dados referentes a este ensaio, três experimentos independentes foram realizados em replicatas de 6 (“n” amostral igual a 6).

4.5. Quantificação da proliferação de *T. gondii* por ensaio de β-galactosidase

Para se analisar o efeito da indução de HO-1, via tratamentos com hemina, sobre o índice de proliferação intracelular de *T. gondii*, células BeWo (3×10^4 células/200µL/poço) e HTR-8/SVneo (1×10^4 células/200µL/poço), retiradas dos frascos de cultura, quantificadas e ajustadas às suas concentrações como descrito (itens 4.4) foram cultivadas, separadamente, em placas de 96 poços em meio a 10% de SFB, sendo mantidas em cultura por 24 horas. Posteriormente, ambas as linhagens foram infectadas com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii*, na proporção de 1 parasito por célula (1:1) em meio a 2% de SFB, sendo incubadas em condições de cultura por 3 horas adicionais. Logo após, o sobrenadante das placas foi descartado, os poços foram lavados com meio incompleto para a retirada de parasitos livres, e as células foram então tratadas, em meio a 10% de SFB por 24 horas e em condições de cultura, com hemina nas mesmas doses anteriormente definidas para o ensaio de viabilidade celular (item 4.4), isto é, nas concentrações de 10, 40, 80, 100 ou 200µM, sendo que, em paralelo, as células também foram tratadas com NaOH a 0,2%, como condição veículo. Além disso, como controle experimental do índice normal da proliferação de *T. gondii*, ambas as

linhagens celulares foram também incubadas apenas com meio a 10% de SFB. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a $176,4 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente, os sobrenadantes dos poços foram cuidadosamente removidos e descartados, e a reação de β -galactosidase foi desenvolvida conforme descrito por Teo e colaboradores (2007), com pequenas modificações.

Para isso, amostras de taquizoítas 2F1 livres foram utilizadas para se construir uma curva padrão duplo-seriada, que se iniciou com 1×10^6 taquizoítas sendo interrompida até o último intervalo de $15,625 \times 10^3$ parasitos totais. A curva desenvolvida foi utilizada como referência para a determinação dos índices de proliferação de *T. gondii* nas diferentes condições de estímulos analisadas. Feito isso, as amostras de células infectadas, em seus distintos tratamentos, bem como a curva padrão, foram incubadas com 100 μ L de tampão de lise RIPA [Tris-HCl a 0,05M; NaCl a 0,150M; Triton X-100 a 1% (v/v); deoxicolato de sódio a 1% (p/v) e SDS a 0,1% (p/v); pH 7,5] gelado, durante 15 minutos e, logo após, incubadas com 160 μ L de tampão de ensaio [*phosphate buffered saline* (PBS) a 0,01M; $MgCl_2$ a 0,009M e β -mercaptoetanol a 0,102M] e com 40 μ L do reagente substrato *Chlorophenol Red-D- β -Galactopyranoside* (CPRG) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) reconstituído em água deionizada a 0,003M, ficando ao abrigo da luz para o desenvolvimento da reação. Por fim, após cerca de 15 minutos, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada em espectrofotômetro de microplacas a 570nm, e os resultados expressos como índice de proliferação intracelular de *T. gondii*, com referência à curva padrão previamente construída. Para a obtenção dos dados referentes a este ensaio, três experimentos independentes foram realizados em replicatas de 9 (“n” amostral igual a 9).

4.6. Western Blotting para detecção da expressão de HO-1 e da fosforilação de proteínas pertencentes à via de sinalização das MAPK (p-p38, p-JNK e p-ERK1/2)

Para a detecção da expressão proteica de HO-1 e do controle constitutivo endógeno β -actina, bem como da fosforilação das proteínas pertencentes à via das MAPK, células BeWo (1×10^6 células/2000 μ L/poço) e HTR-8/SVneo (5×10^5 células/2000 μ L/poço) foram cultivadas, separadamente, em placas de 6 poços (Nest Biotech Co), ou também, células BeWo (4×10^5 células/500 μ L/poço) e HTR-8/SVneo (2×10^5 células/500 μ L/poço) foram cultivadas em placas de 12 cavidades (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EUA), sendo que em ambos os delineamentos experimentais, as células foram mantidas em meio a 10% de SFB e incubadas em condições de cultura por 24 horas. Posteriormente, as linhagens celulares foram

infectadas, ou não, com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii*, na proporção de 1 parasito por célula (1:1) em meio a 2% de SFB, sendo mantidas em cultura por 3 horas adicionais. Logo após, os sobrenadantes dos poços foram descartados, as células foram lavadas com meio incompleto para a retirada de parasitos livres e então tratadas por 24 horas, em condições de cultura, com hemina a 80 μ M ou com NaOH a 0,08% (veículo), em meio a 10% de SFB. Posteriormente, os sobrenadantes dos poços foram coletados e armazenados à temperatura de -80°C para posterior dosagem de citocinas e mensuração de nitrito, ao passo que as células foram destacadas dos poços de cultivo com o auxílio de *cell scraper*, em novo meio a 10% de SFB, sendo em seguida centrifugadas a 176,4 x g e lisadas com 100 a 150 μ L de tampão de lise RIPA gelado, suplementado com o coquetel de inibidores de proteases Complete[®] Lysis-M, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH), acrescido dos inibidores de fosfatases, ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) a 0,001M e fluoreto de sódio (NaF) a 0,025M (ambos Sigma-Aldrich). Os lisados celulares foram então submetidos a três ciclos de congelamento (por meio de N₂) e descongelamento (aquecimento em água a 37°C), incubados a 0°C por 15 minutos e centrifugados a 7840 x g por 15 minutos a 4°C. Logo após, as amostras de sobrenadantes obtidos foram, neste momento, coletadas e armazenadas a -80°C até a realização de dosagem proteica total pelo método de Bardford (BRADFORD, 1976), sendo mantidas nesta temperatura até o efetivo desenvolvimento das reações de *western blotting*.

Em uma próxima etapa, a concentração proteica obtida (μ g/mL) foi ajustada em cada amostra, de maneira que 80 μ g dos conteúdos de proteínas totais foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12%), sob condições desnaturantes. Posteriormente, as proteínas segregadas pela eletroforese foram transferidas dos géis para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon[®]-FL, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), as quais, logo após, foram incubadas com tampão de *blotting* [Tris-HCl a 0,025M; NaCl a 0,15M e Tween 20 a 0,1% (v/v); pH 7,4) acrescido de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé[®], São Paulo, SP, Brasil) a 4%, sob agitação constante por 1 hora a temperatura ambiente, para o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas.

Em seguida, as membranas foram rapidamente lavadas em tampão de *blotting* e incubadas *overnight* (12 horas), a temperatura ambiente e sob agitação constante, com os seguintes anticorpos primários, em suas respectivas diluições realizadas em tampão de *blotting* contendo leite desnatado (Molico) a 2%: policlonal de cabra anti-HO-1 humana (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), policlonal de coelho anti-p38-MAPK fosforilada humana (T¹⁸⁰/Y¹⁸²) (1:400) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), policlonal de coelho anti-JNK fosforilada humana (T¹⁸³/Y¹⁸⁵) (1:400) (R&D Systems), monoclonal de

coelho anti-ERK1/2 fosforilada humana (T²⁰²/Y²⁰⁴-T¹⁸⁵/Y¹⁸⁷) (1:1000) (R&D Systems), ou monoclonal de camundongo anti- β -actina humana (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, as membranas passaram por sucessivas lavagens de 30 minutos totais em tampão de *blotting* e foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante, com os seguintes anticorpos secundários conjugados com *horseradish peroxidase* (HRP), em suas respectivas diluições realizadas em tampão de *blotting* contendo leite em pó desnatado (Molico) a 2%: IgG de coelho anti-IgG de cabra (1:3000 para detecção de HO-1) (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, Inglaterra), IgG de cabra anti-IgG de coelho (1:1000 para detecção de *p*-p38-MAPK e *p*-JNK) (R&D Systems) ou IgG de cabra anti-IgG de camundongo (1:3000 para detecção de β -actina) (Sigma-Aldrich). Em paralelo, como anticorpo secundário para a detecção de *p*-ERK1/2, as membranas foram incubadas com IgG de cabra anti-coelho biotinilada (conjugada à biotina) (1:1000) (Sigma-Aldrich), por 2 horas, à temperatura ambiente e sob agitação constante, em tampão de *blotting* contendo leite em pó desnatado (Molico) a 2%. Logo em seguida, apenas as membranas de detecção de *p*-ERK1/2 foram lavadas por mais 30 minutos e incubadas com o complexo de amplificação de estreptavidina acoplada à peroxidase (SAv-HRP) (1:1000) (Sigma-Aldrich), por 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante, também em tampão de *blotting* contendo leite em pó desnatado (Molico) a 2%.

Finalmente, após novas e sucessivas lavagens de 30 minutos totais, todas as reações foram reveladas por meio do kit de quimioluminescência SuperSignal[®] West Pico (Thermo Fisher Scientific), sendo que a intensidade das bandas contendo as proteínas de interesse foram visualizadas pelo aparelho transluminador ChemiDoc[™] MP *Imaging System* e as análises de densitometria realizadas pelo programa *Image Lab[™] Software* (ambos de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os dados obtidos foram demonstrados como imagens representativas contendo as bandas de expressão e gráficos quantitativos de densitometria para HO-1, *p*-p38-MAPK, *p*-JNK e *p*-ERK1/2, obtidos com base nos valores numéricos médios calculados para cada proteína avaliada, em função de sua razão com os dados de β -actina correspondentes, em todas as condições experimentais analisadas. Para a obtenção dos dados referentes a este ensaio, dois experimentos independentes foram realizados em replicatas de 6 (“*n*” amostral igual a 6).

4.7. Quantificação dos níveis intracelulares de heme e dosagem de bilirrubina

Como parâmetros de determinação da atividade funcional de HO-1, os níveis intracelulares totais de heme, bem como bilirrubina, subproduto proveniente de seu catabolismo, foram mensurados em ambas as linhagens celulares em suas distintas condições experimentais. Para esta finalidade, células BeWo (2×10^5 células/500 μ L/poço) e HTR-8/SVneo (6×10^4 células/500 μ L/poço) foram cultivadas, separadamente, em placas de 24 poços (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) e em meio a 10% de SFB, sendo mantidas em cultura por 24 horas. Posteriormente, ambas as linhagens foram infectadas, ou não, com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii*, na proporção de 1 parasito por célula (1:1) em meio a 2% de SFB, sendo incubadas em cultura por 3 horas adicionais. Logo após, o sobrenadante das placas foi removido, os poços foram lavados com meio incompleto para a retirada de parasitos livres, e as células foram então tratadas em meio a 10% de SFB, por 24 horas e em condições de cultura, com hemina a 80 μ M e, em paralelo, com NaOH a 0,08%, como condição veículo. Posteriormente, as monocamadas celulares aderidas aos poços foram direcionadas à dosagem dos conteúdos intracelulares totais de heme, como previamente descrito (MOTTERLINI et al., 1995; FORESTI et al., 2003), e os sobrenadantes de cultura das células foram coletados e utilizados para dosagem de bilirrubina, como também previamente estabelecido (TURCANU; DHOUIB; POINDRON, 1998; CLARK et al., 2000; FORESTI et al., 2003), com adaptações.

Simplificadamente para a dosagem de heme, após a retirada e a coleta dos sobrenadantes as monocamadas celulares foram imediatamente solubilizadas pela adição de 1mL de ácido fórmico puro 85% P.A (CH_2O_2) aos poços de cultivo e, em seguida, alíquotas de 200 μ L destas soluções ácidas de células lisadas, em suas diferentes condições experimentais, foram transferidas para poços de microtitulação em placa de baixa afinidade (Kartell SPA, Novigilio, Milão, Itália). Logo após, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro de microplacas a 398nm e os resultados foram expressos como os valores de densidade óptica obtidos neste comprimento de onda ($\text{DO}_{398\text{nm}}$), em um coeficiente de absorvidade molar descrito por “ $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ” (MOTTERLINI et al., 1995).

Em paralelo, para a dosagem dos níveis de bilirrubina secretados por ambas as linhagens celulares, 500 μ L das amostras de sobrenadantes de cultura previamente reservados foram adicionados a 250mg de cloreto de bário anidro puro (BaCl_2) e homogeneizados em agitador tipo vortex, por duas vezes de 10 a 15 segundos em cada uma. Em seguida, às soluções saturadas de BaCl_2 dissolvido nos sobrenadantes, foram adicionados 750 μ L de benzina de petróleo pura (contendo benzeno) e as amostras foram novamente homogeneizadas, vigorosamente, em agitador por 50 a 60 segundos. Logo após, as soluções, nesta etapa com aparência branca viscosa, foram centrifugadas a 13000 x g por 30 minutos a temperatura

ambiente (25°C) e, finalizado este tempo, alíquotas de 200µL da fase benzênica superior formada nas amostras, na qual a bilirrubina extraída permanece retida por afinidade molecular, foram transferidas rapidamente para poços de microtitulação em placa de baixa afinidade e as absorbâncias foram determinadas, primeiramente a 450nm e, posteriormente, a 600nm, em espectrofotômetro de microplacas. Alíquotas de 500µL de hemina a 80µM e de NaOH a 0,08%, não incubadas com células, foram conduzidas no período de tratamento em cultura e também submetidas a este procedimento de dosagem de bilirrubina, com o intuito de se retirar o “*background*” (falso positivo) das amostras, gerado pelas tonalidades colorimétricas destes estímulos. Os resultados foram expressos como a diferença entre os valores de densidade óptica obtidos ($\Delta = DO_{450nm} - DO_{600nm}$), dos quais os valores do “*background*” de hemina ou veículo também foram subtraídos ($Bilirrubina = \Delta_{AMOSTRAS} - \Delta_{BACKGROUND}$), sendo o coeficiente de absorvidade molar para este ensaio descrito por “ $\epsilon^{450} = 27,3mM^{-1} \times cm^{-1}$ ” (TURCANU; DHOUIB; POINDRON, 1998).

Por fim, após a obtenção final dos dados da quantificação de heme intracelular e de bilirrubina secretada, substrato e subproduto de HO-1, respectivamente, a atividade de HO-1 para células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não, pôde ser determinada pela razão numérica entre bilirrubina e heme ($Razão = Bilirrubina/Heme$), como um parâmetro de análise complementar. Para a obtenção dos dados referentes a este ensaio, um experimento foi realizado em replicatas de 6 (“*n*” amostral igual a 6).

4.8. Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os níveis de secreção das citocinas humanas MIF, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF nos sobrenadantes de células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii* e tratadas com hemina, foram mensurados pelo ensaio imunoenzimático “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*” (ELISA) do tipo “*sandwich*”, de acordo com as instruções recomendadas pelos fabricantes, para MIF (DuoSet[®], R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) ou para as demais citocinas (OptEIA[™], BD Bioscience, San Diego, CA, EUA).

Para esta finalidade, placas de microtitulação em poliestireno de alta afinidade, com 96 cavidades (SPL Life Sciences Co., Ltd, Pocheon-si, Gyeonggi, Coreia do Sul), foram sensibilizadas *overnight* (12 horas) a 4°C com os anticorpos monoclonais de captura anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10 ou anti-TNF humanos, em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 - $NaHCO_3$) a 0,1M (pH 9,5), além de anti-MIF humano, em PBS a 0,01M, a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas passaram por repetidas lavagens com PBS a 0,01M

acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS-T 0,05%) e foram incubadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com as soluções de bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas, compostas de PBS a 0,01M contendo SFB a 10%, para as reações de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF, ou de PBS a 0,01M contendo soro albumina bovina (BSA) a 1% (Sigma-Aldrich), para a reação de MIF. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com PBS-T 0,05% e 50µL das amostras de sobrenadantes de cultura foram adicionadas aos poços, permanecendo incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Em paralelo à adição das amostras aos poços, as curvas padrões de cada citocina recombinante foram construídas por meio de diluições duplo-seriadas, permanecendo também em incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Após este período, as placas passaram por sucessivas lavagens e os seus poços foram incubados com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10 ou anti-TNF humanos, acrescidos do conjugado de amplificação estreptavidina acoplada à peroxidase (SAv-HRP), por 1 hora, além de anti-MIF humano, por 2 horas, todos à temperatura ambiente. Logo em seguida, apenas para MIF, os poços foram incubados com conjugado SAv-HRP, por 20 minutos, também a temperatura ambiente. Ao fim desta última etapa, as placas foram novamente lavadas e as reações foram desenvolvidas pela adição do substrato enzimático composto de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich) adicionada de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,01%, diluídos em tampão TMB [ácido cítrico (C₆H₈O₇) a 0,1M; fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) a 0,2M; pH 4,5] para a revelação dos imunocomplexos formados, por cerca 30 minutos à temperatura ambiente. As reações foram interrompidas com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2N e a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro de microplacas a 450nm. Os dados obtidos foram expressos em pg/mL de acordo com as curvas padrões construídas, sendo que os limites de detecção para cada citocina foram os seguintes: 3,1pg/mL (IL-8); 4,7pg/mL (IL-6); 7,8pg/mL (TNF e IL-10) e 125pg/mL(MIF).

4.9. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por dosagem de nitrito

As concentrações de nitrito (NO₂⁻) nos sobrenadantes de cultura de ambas as linhagens celulares foram mensuradas conforme descrito pelo método de Griess (GREEN et al., 1982), como um indicativo da produção de óxido nítrico (NO) nas condições avaliadas.

Com esta finalidade, alíquotas de 50µL dos sobrenadantes anteriormente coletados, provenientes de células em suas diferentes condições experimentais, foram transferidos para poços de uma placa de baixa afinidade e homogeneizados com o reagente de Griess,

composto de sulfanilamida a 1% e de diidrocloreto de naftaleno (NEED) a 0,1%, ambos diluídos em solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 2,5%, na proporção de 1:1. A seguir, a reação foi desenvolvida ao abrigo da luz, por cerca de 10 minutos, e a absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro de microplacas a 548nm, sendo os resultados calculados e expressos com referência a uma curva padrão construída com nitrito de sódio (NaNO_2), variando de 200 a 3,125 μM . Por fim, como branco da reação foi utilizado apenas meio a 10% de SFB (diluyente da curva padrão) e para se retirar o “background” (falso positivo) das amostras, gerado pelas tonalidades colorimétricas dos estímulos, 50 μL de soluções de hemina a 80 μM e de NaOH a 0,08% não incubadas com células e mantidas em cultura durante o mesmo período de tratamento, foram também submetidas à reação de Griess, sendo seus valores obtidos, subtraídos dos resultados de cada amostra de células que foram expostas a algum dos dois tratamentos.

4.10. Análises estatísticas

Para a realização das análises estatísticas dos resultados foi utilizado o *software GraphPad Prism® Version 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov sendo que, quando paramétricos, foram posteriormente analisados pelo teste *t* de Student, para comparações entre grupos pares, ou pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste por comparações múltiplas de Bonferroni, para investigações entre grupos múltiplos. Quando não paramétricos, isto é, não validados via teste de normalidade, os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, para comparações entre resultados pares, ou pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de por comparações múltiplas de Dunn, para investigações entre grupos múltiplos. Por fim, os dados analisados foram expressos graficamente como a média \pm o erro padrão da média (SEM) e as diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise do efeito de hemina na viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo

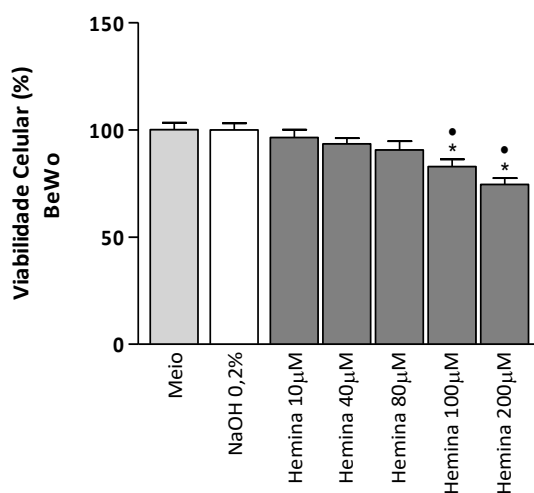
Como uma primeira etapa experimental, a viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo frente ao tratamento com hemina foi analisada através do ensaio colorimétrico de MTT, a fim de determinar possíveis efeitos citotóxicos desta porfirina nas linhagens celulares e, posteriormente, utilizá-la como fármaco indutor de HO-1, nos experimentos que se seguiram. Com tais finalidades, células BeWo e HTR-8/SVneo foram estimuladas por um período de 24 horas com hemina, nas concentrações de 10, 40, 80, 100 ou 200 μ M, ou com o diluente da droga, NaOH a 0,2% (veículo), ou apenas foram incubadas com meio, e as taxas de viabilidade de ambas as linhagens foram analisadas.

Os resultados obtidos, em porcentagem de células viáveis, demonstraram que células BeWo não tiveram sua viabilidade alterada quando tratadas com hemina a 10, 40 ou 80 μ M (Figura 2A). Contudo, ao serem estimuladas com o indutor a 100 e 200 μ M, estas células apresentaram viabilidade de 82,8% e 74,5%, respectivamente, em comparação com a condição meio, controle com 100% de viabilidade, ou NaOH a 0,2%, veículo com 99,9% de viabilidade ($P<0,05$) (Figura 2A). Por outro lado, em todas as condições de estímulos com hemina às quais foram expostas, células HTR-8/SVneo apresentaram alteração em sua viabilidade, desde a condição de menor dose, a 10 μ M (92,9%), em comparação apenas com meio ($P<0,05$), controle com 100% de viabilidade, até às concentrações do fármaco progressivamente maiores, a 40 μ M (87,2%), 80 μ M (83,2%), 100 μ M (84,1%) ou 200 μ M (74,6%), todas estas em comparação com ambos meio ou NaOH a 0,2%, com 97% de viabilidade ($P<0,05$) (Figura 2B).

Com base nos parâmetros comparativos realizados através desta análise de viabilidade celular, pode-se concluir, inicialmente, que os tratamentos com hemina demonstraram maiores efeitos de citotoxicidade às células HTR-8/SVneo, quando as mesmas condições de tratamento foram investigadas em células BeWo. Apesar dos dados obtidos revelarem pequenas, porém significativas, quedas na viabilidade destas células citotrofoblásticas, nós decidimos utilizar as mesmas concentrações de hemina, aqui empregadas, para a realização dos ensaios de proliferação intracelular de *T. gondii*, a fim de desvendarmos qual seria o possível efeito biológico de cada uma destas doses sobre o índice de parasitismo nestas duas linhagens de citotrofoblasto.

Figura 2

A



B

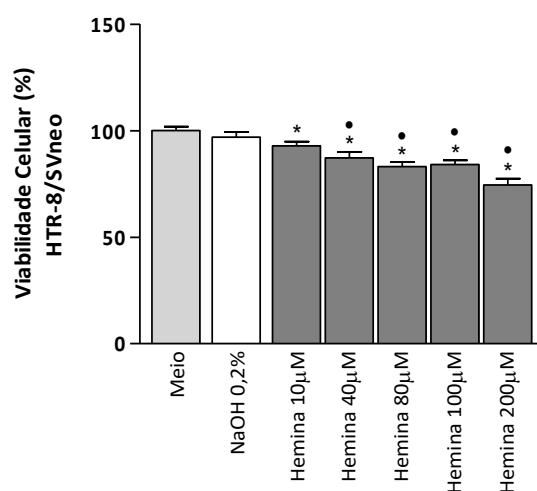


Figura 2. Análise da viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo frente aos tratamentos com hemina. Células (A) BeWo e (B) HTR-8/SVneo foram cultivadas, separadamente, por 24 horas. Em seguida, foram tratadas com hemina a 10, 40, 80, 100 ou 200µM, ou com NaOH a 0,2% (veículo) ou apenas incubadas com meio (controle), e permaneceram em cultura por 24 horas adicionais. Por fim, a viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT, sendo que os índices de viabilidade foram expressos em porcentagem (%) e calculados pela razão da quantidade de células viáveis em cada condição de tratamento (ou de veículo), em função do valor de células resultantes na condição meio (100%), tendo como referência a análise das densidades ópticas (OD) obtidas. Os dados descritos representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em replicatas de 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (*)(•). Teste One-Way ANOVA com pós-teste por comparações múltiplas de Bonferroni. (*) Comparação entre células (A) BeWo ou (B) HTR-8/SVneo tratadas com hemina e seus respectivos controles de células não tratadas (meio); (•) Comparação entre células (A) BeWo ou (B) HTR-8/SVneo tratadas com hemina e seus respectivos veículos de células tratadas com NaOH a 0,2%.

5.2. O estímulo com hemina eleva os índices de proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo

Após a determinação do efeito dos tratamentos com hemina na viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo, buscou-se avaliar a possível influência da indução de HO-1 sobre as taxas de replicação de *T. gondii*, em ambas as linhagens trofoblásticas. Para isso, após terem sido infectadas experimentalmente com os taquizoítas clone 2F1, as células foram tratadas com hemina a 10, 40, 80, 100 ou 200 μ M e os índices de proliferação intracelular do parasito foram mensurados por meio da reação enzimática de β -galactosidase.

Em ambas as linhagens celulares, a indução de HO-1 beneficiou o parasitismo, uma vez que os tratamentos com hemina aumentaram os índices de infecção (Figura 3). Em células BeWo (Figura 3A), os estímulos com o fármaco foram capazes de induzir aumento significativo da carga parasitária, nas concentrações de 80, 100 e 200 μ M ($P<0,05$) em comparação com o controle (meio) ou com o veículo (NaOH a 0,2%), sendo que as doses de 10 e 40 μ M não exerceram influências na susceptibilidade destas células ao parasito. De maneira similar, a indução de HO-1 em células HTR-8/SVneo (Figura 3B) também contribuiu com a elevação do parasitismo, visto que os tratamentos com hemina a 40, 80 e 100 μ M, amplificaram significativamente o índice de infecção desta linhagem celular em comparação com as condições controle (meio) ou veículo (NaOH a 0,2%) ($P<0,05$). Por outro lado, os estímulos com a menor (10 μ M) e a maior (200 μ M) dose da porfirina não contribuíram com o aumento da permissividade destas células à proliferação do parasito.

Os dados apresentados permitem concluir que o tratamento de células BeWo e HTR-8/SVneo com hemina é capaz de contribuir com a proliferação de *T. gondii*, aumentando a susceptibilidade destas populações celulares à infecção pelo parasito. Portanto, o estímulo de hemina a 80 μ M foi escolhido para a execução dos experimentos subsequentes envolvidos com a indução de HO-1, uma vez que esta dose se comportou como a menos citotóxica a ambas as linhagens celulares, capaz de elevar, simultaneamente, a replicação do parasito em células BeWo e HTR-8/SVneo.

Figura 3

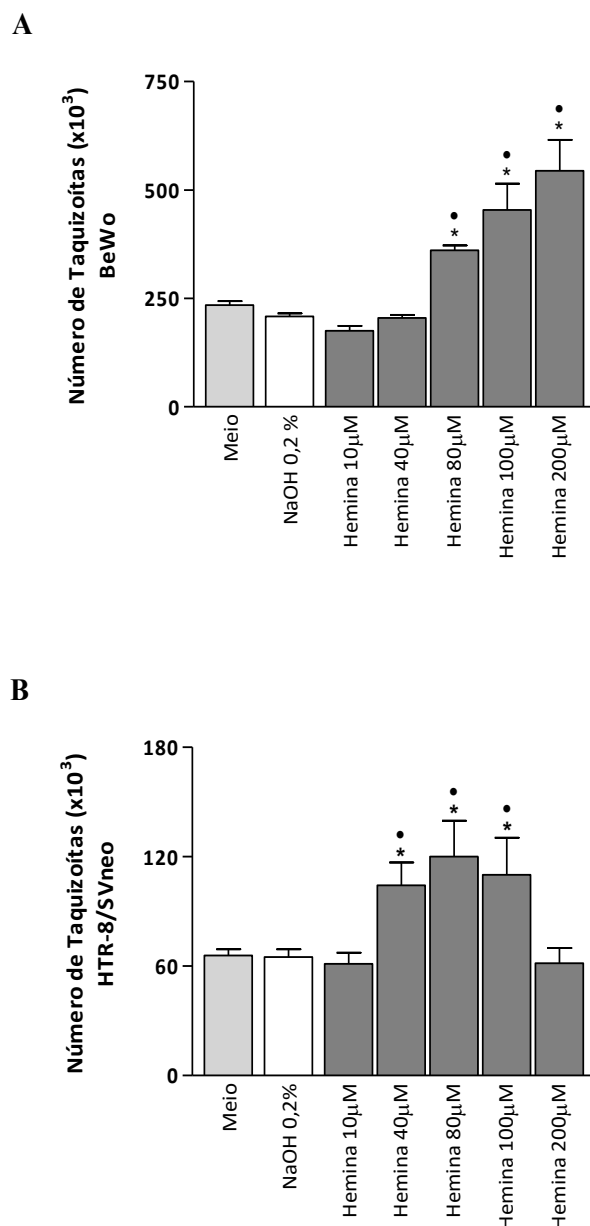


Figura 3. Influência dos tratamentos com hemina na proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células (A) BeWo e (B) HTR-8/SVneo foram cultivadas, separadamente, por 24 horas. Em seguida, foram infectadas com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii* (1 parasito por célula) e mantidas em cultura por 3 horas adicionais. Logo após, foram tratadas com hemina a 10, 40, 80, 100 ou 200µM, ou com NaOH a 0,2% (veículo) ou apenas incubadas com meio (controle), e permaneceram em cultura por mais 24 horas. Por fim, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi mensurada através da reação de β-galactosidase e os índices de replicação do parasito foram expressos como o número de taquizoítas (x10³), calculados com referência à curva padrão de taquizoítas livres (1x10⁶ a 15,625x10³ parasitos). Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em replicatas de 9. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (*) (•). Teste One-Way ANOVA com pós-teste por comparações múltiplas de Bonferroni. (*) Comparação entre células (A) BeWo ou (B) HTR-8/SVneo tratadas com hemina e seus respectivos controles de células não tratadas (meio); (•) Comparação entre células (A) BeWo ou (B) HTR-8/SVneo tratadas com hemina e seus respectivos veículos de células tratadas com NaOH a 0,2%.

5.3. A expressão de HO-1 em células BeWo é reduzida frente à infecção por *T. gondii* e elevada por hemina, mantendo-se inalterada em células HTR-8/SVneo

Sabendo-se que a indução de HO-1 contribuiu com o aumento da susceptibilidade de células trofoblásticas vilosas BeWo e extravilosas HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*, o próximo passo consistiu em investigar quais seriam as possíveis influências exercidas pelo parasitismo e/ou por hemina, na expressão da enzima em ambas as linhagens celulares.

Os dados de bandas proteicas obtidas pelas reações de *western blotting* (Figura 4A), bem como de expressão relativa média calculada a partir das análises de densitometria (Figura 4B), revelaram que, ao serem expostas à infecção pelo parasito, células BeWo reduziram significativamente ($P=0,0317$) a expressão de HO-1, em comparação com células não infectadas, assim como também não tratadas. Quando analisadas nas mesmas condições, células HTR-8/SVneo apresentaram uma tendência em reduzir a expressão da enzima, embora não estatisticamente significativa quando infectadas com *T. gondii* em comparação com células não infectadas. No momento em que foram estimuladas com hemina, células BeWo não infectadas ($P=0,0002$) ou infectadas ($P=0,0010$) demonstraram uma elevada expressão de HO-1, ao serem comparadas às células não tratadas com a porfirina (NaOH), e igualmente não infectadas ou infectadas pelo parasito, respectivamente. Por sua vez, quando analisadas nestes mesmos parâmetros experimentais, células HTR-8/SVneo mantiveram a expressão da enzima inalterada, ao serem tratadas com hemina estando infectadas ou não infectadas. Células HTR-8/SVneo não infectadas e não tratadas com hemina (NaOH) apresentaram uma tendência, embora não estatisticamente significativa, de menor expressão de HO-1 em relação às células BeWo, quando estas estiveram igualmente não infectadas e não tratadas. Além disso, os resultados comparativos entre as linhagens celulares possibilitam evidenciar que, sob influência do estímulo com hemina, a expressão de HO-1 em células HTR-8/SVneo não infectadas ($P=0,0022$) ou infectadas ($P=0,0043$) por *T. gondii* foi significativamente menor em relação a elevada expressão da enzima por células BeWo tratadas, bem como não infectadas ou infectadas, respectivamente.

A compreensão destes dados relativos à expressão de HO-1 levam a concluir que, células BeWo são capazes de responder à infecção por *T. gondii* e à indução da enzima com a redução e com o aumento, respectivamente, da expressão de HO-1, sendo que, frente a estas mesmas condições, células HTR-8/SVneo são incapazes de modular seus níveis de expressão da enzima.

Figura 4

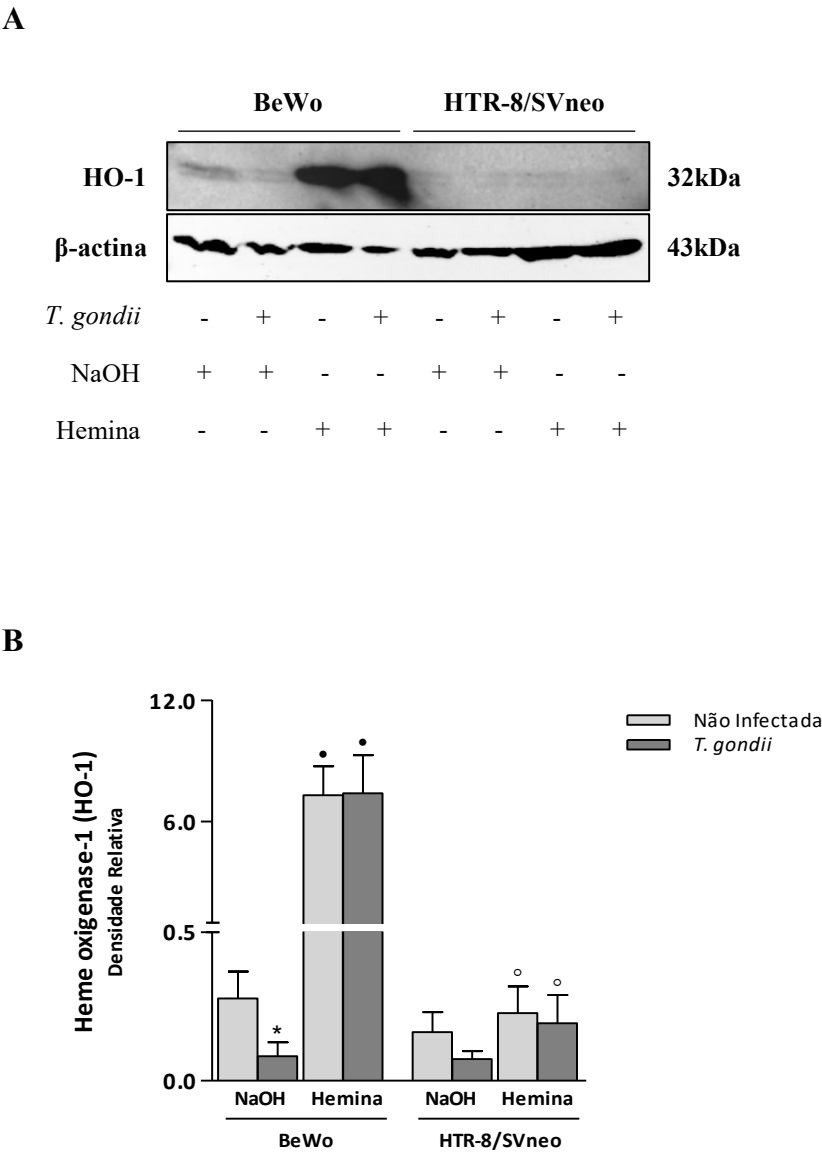


Figura 4. Expressão de HO-1 por células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo e HTR-8/SVneo foram cultivadas, separadamente, por 24 horas. Em seguida, foram infectadas, ou não, com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii* (1 parasito por célula) e mantidas em cultura por 3 horas adicionais. Logo após, foram tratadas com hemina a 80µM ou com NaOH a 0,08% (veículo) e permaneceram em cultura por mais 24 horas. Por fim, as células foram lisadas e os conteúdos de proteínas totais foram mensurados (µg/mL), sendo que 80µg destes foram submetidos à eletroforese e transferidos para membranas de PVDF, nas quais as reações de *western blotting* para detecção de HO-1 e de β-actina foram realizadas. (A) Imagens representativas das bandas de expressão de HO-1 e de β-actina em células BeWo e HTR-8/SVneo. (B) Dados de densidade relativa de HO-1 normalizados em função do controle endógeno (β-actina), obtidos por densitometria das bandas de expressão em células BeWo e HTR-8/SVneo e representativos da média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em replicatas de 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P<0,05$ (*)(•)(°). Teste de Mann-Whitney. (*) Comparação entre células infectadas e não infectadas, dentro da mesma linhagem e tratamento; (•) Comparação entre células tratadas com hemina e não tratadas, dentro da mesma linhagem e condição de infecção, ou não; (°) Comparação entre as linhagens celulares, dentro das mesmas condições de infecção e tratamento, ou não.

5.4. Em infecção por *T. gondii*, a atividade funcional de HO-1 é reduzida em células BeWo e inalterada em células HTR-8/SVneo

Após a avaliação da expressão de HO-1 em células BeWo e HTR-8/SVneo, os conteúdos intracelulares de heme (Figura 5A), os níveis de bilirrubina secretada (Figura 5B e 5D), bem como o índice de atividade funcional de HO-1 (Figura 5C), foram determinados.

Com relação à heme resultante (Figura 5A), células BeWo ou HTR-8/SVneo infectadas não apresentaram alterações em sua disponibilidade intracelular, quando relacionadas aos seus respectivos controles não infectados. Contudo, em comparação com células BeWo infectadas ($P=0,0048$) ou não ($P=0,0048$), células HTR-8/SVneo, nas respectivas condições, apresentaram índices significativamente menores de conteúdo total de heme (Figura 5A).

Em paralelo, as linhagens celulares foram também analisadas quanto à produção de bilirrubina, liberada nos sobrenadantes de cultura, como subproduto metabólico indicativo da atividade de HO-1 (Figura 5B). Os dados obtidos indicam que na presença de *T. gondii*, células BeWo apresentaram uma produção de bilirrubina significativamente menor ($P<0,0001$) quando comparadas a células não expostas ao parasito, sendo que este mesmo comportamento, não observado em células HTR-8/SVneo infectadas. Além disso, ao serem comparadas com células BeWo, frente à infecção pelo parasito ($P=0,0092$) ou não ($P=0,0001$), células HTR-8/SVneo apresentaram índices expressivamente menores de bilirrubina liberada, quando avaliadas nas mesmas condições (Figura 5B).

Posteriormente, o índice de atividade funcional de HO-1, baseado na razão da quantidade de bilirrubina liberada pelo conteúdo total de heme mensurado, foi calculado para células BeWo e HTR-8/SVneo expostas a *T. gondii* (Figura 5C). A partir desta análise, verificou-se de forma significativa que, em infecção ($P=0,0002$), células BeWo demonstraram uma menor atividade funcional de HO-1, em comparação às células não infectadas pelo parasito, sendo que neste mesmo contexto, células HTR-8/SVneo não indicaram alterações na atividade funcional da enzima. Além disso, ao serem relacionadas às células BeWo, frente ao parasito ($P=0,0184$) ou não ($P=0,0003$), células HTR-8/SVneo apresentaram índices de atividade funcional da enzima significativamente reduzidos (Figura 5C).

Em última análise, a interferência do tratamento com hemina na produção de bilirrubina foi observada em células BeWo ($P<0,0001$) e HTR-8/SVneo ($P=0,0314$) infectadas, as quais apresentaram níveis significativamente maiores de secreção deste metabólito, quando comparadas aos seus respectivos controles de células expostas à *T. gondii*, mas não tratadas com a porfirina (NaOH) (Figura 5D). Além disso, é válido salientar que, em todas as

condições avaliadas, células HTR-8/SVneo demonstraram atividade funcional significativamente menor de HO-1, em relação às células BeWo, uma vez que nas células de linhagem trofoblástica extravilosa, não infectadas e posteriormente tratadas ($P<0,0001$) ou não ($P=0,0001$), ou infectadas e em seguida estimuladas ($P=0,0041$) ou não ($P=0,0092$) com hemina, os índices numéricos que indicam a atividade funcional da enzima foram estatisticamente inferiores quando comparados aos mesmos índices obtidos nas células de linhagem trofoblástica vilosa (Figura 5D).

Os resultados destas análises propõem que a atividade funcional de HO-1, desempenhada por células BeWo e HTR-8/SVneo expostas à infecção por *T. gondii*, foi aumentada no momento em que estas linhagens celulares receberam o tratamento com hemina. Entretanto, quando analisadas apenas no contexto de infecção pelo parasito, isto é, sem a interferência do tratamento com a porfirina, células BeWo apresentaram a capacidade de reduzir a atividade funcional da enzima, fenômeno este, ausente em células HTR-8/SVneo avaliadas no mesmo contexto.

Figura 5

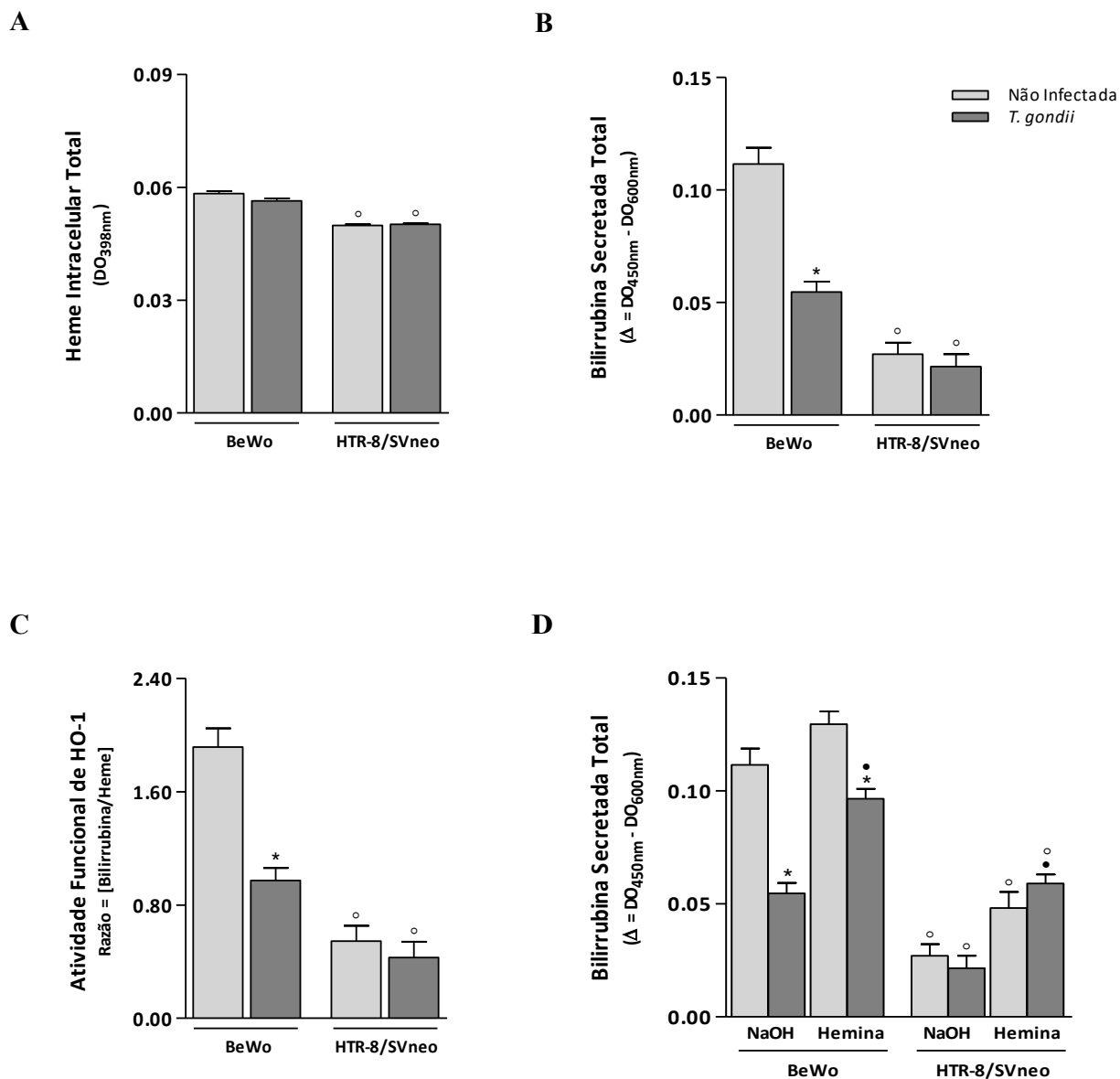


Figura 5. Atividade de HO-1 por células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo e HTR-8/SVneo foram cultivadas, separadamente, por 24 horas. Em seguida, foram infectadas, ou não, com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii* (1 parasito por célula) e mantidas em cultura por 3 horas adicionais. Logo após, foram tratadas com hemina a 80µM ou com NaOH a 0,08% (veículo) e permaneceram em cultura por mais 24 horas. Por fim, as monocamadas celulares tiveram seus conteúdos intracelulares totais de heme quantificados e os níveis de bilirrubina secretada foram mensurados nos sobrenadantes de cultura resultantes. (A) Conteúdo intracelular total de heme. (B e D) Níveis de bilirrubina secretada. (C) Atividade funcional de HO-1. Os dados representam a média \pm SEM de um experimento realizado em replicatas de 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (*) (•) (°). (A) Teste de Mann-Whitney; (B e C) Teste *t* de Student. (*) Comparação entre células infectadas e não infectadas, dentro da mesma linhagem e tratamento; (•) Comparação entre células tratadas com hemina e não tratadas, dentro da mesma linhagem e condição de infecção, ou não; (°) Comparação entre as linhagens celulares, dentro das mesmas condições de infecção e tratamento, ou não.

5.5. Em infecção por *T. gondii*, a fosforilação de p38-MAPK em células BeWo demonstra associação com a indução de HO-1

Com a obtenção dos dados referentes à expressão e à atividade de HO-1 nas linhagens celulares estudadas, a participação da via de sinalização das MAPK, sustentada pela fosforilação de seus componentes p38-MAPK, JNK e ERK1/2 foi investigada, neste contexto (Figura 8), como possível mecanismo de atuação de HO-1 vinculada à infecção por *T. gondii*.

Ao ser avaliada, a fosforilação de p38-MAPK (Figuras 6A e 6B) em células BeWo ($P=0,0152$) e HTR-8/SVneo ($P=0,0043$) não tratadas (NaOH) e infectadas demonstrou uma redução significativa em relação à sua ativação em ambas as linhagens celulares também não tratadas (NaOH), mas não infectadas. Quando analisada frente à indução de HO-1 por hemina, a expressão de *p*-p38-MAPK por células BeWo infectadas e tratadas com hemina foi significativamente maior ($P=0,0260$) que a ativação desta MAPK em células infectadas, porém, não estimuladas com a porfirina, sendo que este mesmo fenômeno não foi observado em células HTR-8/SVneo nas mesmas condições. Além disso, quando a fosforilação de p38-MAPK foi avaliada comparativamente entre as linhagens celulares, células HTR-8/SVneo infectadas, não tratadas (NaOH) ($P=0,0152$) ou tratadas com hemina ($P=0,0087$), apresentaram menor ativação desta via de sinalização ao serem relacionadas com células BeWo, expostas às mesmas condições experimentais. Em seguida, a participação de JNK foi também investigada (Figuras 6C e 6D), e os resultados obtidos indicam que fosforilação desta MAPK na linhagem HTR-8/SVneo foi influenciada pelo tratamento com hemina, uma vez que estas células quando estimuladas com a porfirina, na presença ($P=0,0091$) ou não ($P=0,0155$) de *T. gondii*, demonstraram maiores índices de *p*-JNK quando comparadas às células infectadas ou não infectadas, respectivamente, mas não tratadas (NaOH). Em células BeWo, a ativação de JNK não foi observada em quaisquer condições avaliadas, mas, apesar deste fato, quando analisada de forma comparativa entre as linhagens, a fosforilação desta quinase por células HTR-8/SVneo estimuladas com hemina, infectadas ($P=0,0113$) ou não ($P=0,0014$), foi expressivamente maior que a encontrada em células BeWo, obtida nas mesmas condições. Por fim, a participação de ERK1/2 (Figuras 6E e 6F), neste contexto, foi também avaliada e os resultados obtidos demonstraram que a fosforilação desta MAPK não apresentou significativa alteração, quando células BeWo foram infectadas ou não, e tratadas ou não com hemina. No entanto, quando células HTR-8/SVneo foram avaliadas, observou-se uma tendência em de redução na expressão de ERK1/2 fosforiladas, quando as células foram infectadas com *T. gondii*, independente do tratamento com hemina.

Os dados obtidos evidenciam que, frente à infecção pelo parasito, a ativação de p38-MAPK apresenta associação com a expressão de HO-1 em células BeWo, desde que foi observada uma menor expressão de ambas quando essa linhagem celular foi infectada por *T. gondii*. Em relação às células HTR-8/SVneo, a infecção pelo parasito diminuiu a expressão de p38-MAPK significativamente, entretanto, pode-se afirmar que esta via de sinalização não esteja envolvida com a expressão de HO-1 nestas células, uma vez que diferenças na detecção da enzima não foram observadas em células HTR-8/SVneo. Além disso, esta linhagem trofoblástica extravilosa apresentou uma tendência em diminuir a expressão das formas fosforiladas de JNK e ERK1/2 na presença de *T. gondii*, apesar de não ser estatisticamente significativa. Esses resultados sugerem que a fosforilação de p38-MAPK está relacionada a expressão de HO-1 em células BeWo, mas não em células HTR-8/SVneo.

Figura 6

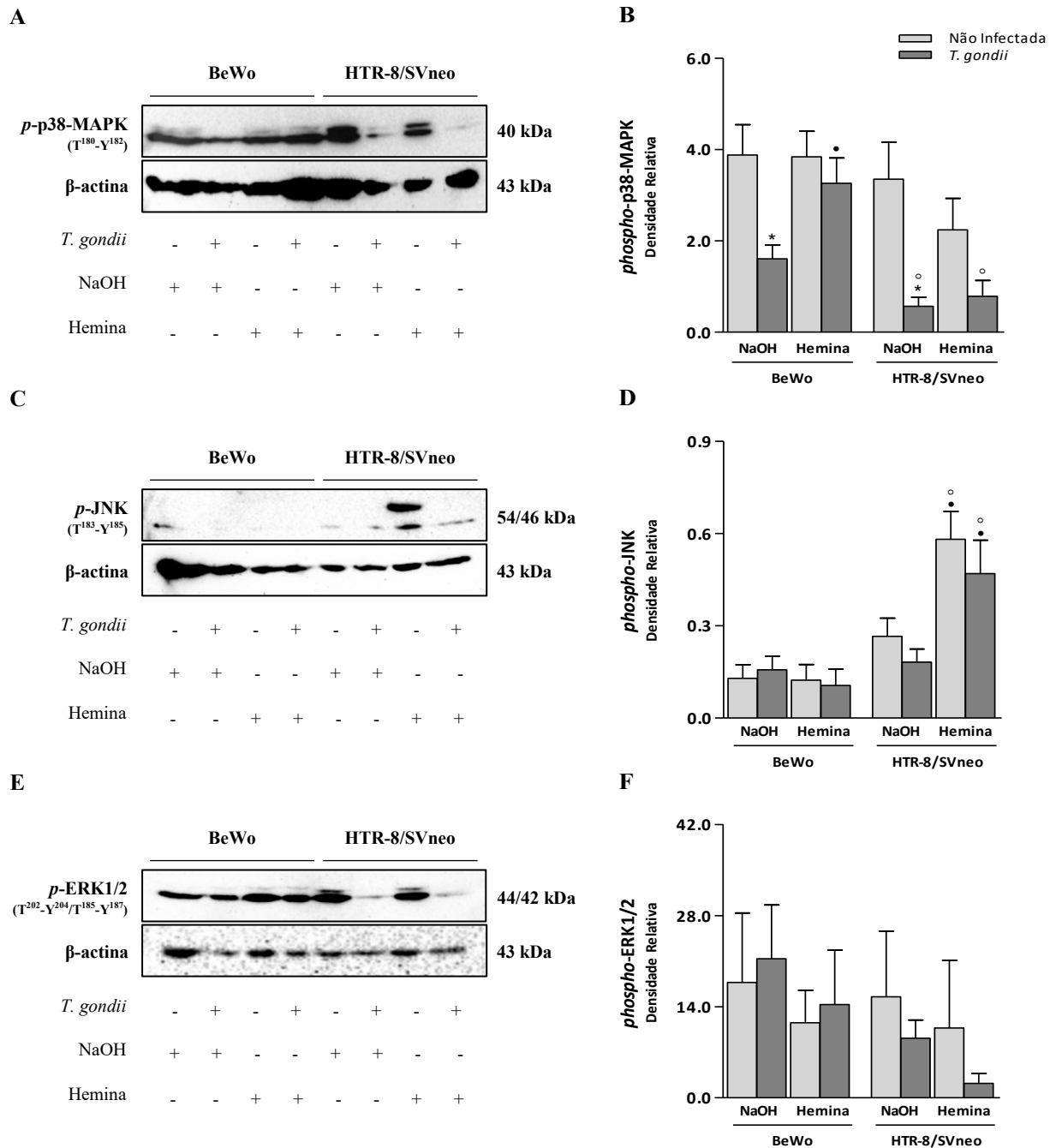


Figura 6. Expressão de *p*-p38-MAPK, *p*-JNK e *p*-ERK1/2 por células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo e HTR-8/SVneo foram cultivadas, separadamente, por 24 horas. Em seguida, foram infectadas, ou não, com taquizoítas clone 2F1 de *T. gondii* (1 parasito por célula) e mantidas em cultura por 3 horas adicionais. Logo após, foram tratadas com hemina a 80 μ M ou com NaOH a 0,08% (veículo) e permaneceram em cultura por mais 24 horas. Por fim, as etapas necessárias às reações de *western blotting* para detecção das formas fosforiladas das MAPK e de β -actina foram realizadas. (A, C e E) Imagens representativas das bandas de expressão de *p*-p38-MAPK, *p*-JNK e *p*-ERK1/2, respectivamente, e de β -actina em células BeWo e HTR-8/SVneo. (B, D e F) Dados de densidade relativa normalizados em função do controle endógeno (β -actina), obtidos por densitometria das bandas de expressão em células BeWo e HTR-8/SVneo e representativos da média \pm SEM de dois experimentos independentes realizados em replicatas de 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (*) (•) (°). (B e F) Teste de Mann-Whitney; (D) Teste *t* de Student. (*) Comparação entre células infectadas e não infectadas, dentro da mesma linhagem e tratamento; (•) Comparação entre células tratadas com hemina e não tratadas, dentro da mesma linhagem e condição de infecção, ou não; (°) Comparação entre as linhagens celulares, dentro das mesmas condições de infecção e tratamento, ou não.

5.6. A infecção por *T. gondii*, e/ou o tratamento com hemina, aumenta as secreções das citocinas MIF, IL-6 e IL-8 por células BeWo ou HTR-8/SVneo

A fim de se investigar a possível participação de citocinas produzidas por células BeWo e HTR-8/SVneo, em infecção por *T. gondii*, na indução do parasitismo e na fosforilação diferencial das MAPK mediadas por HO-1, as concentrações de MIF, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF, nos sobrenadantes de cultura de ambas as células, foram mensuradas por ensaio imunoenzimático (ELISA) (Figura 7).

De forma significativa, os resultados obtidos indicam que células HTR-8/SVneo infectadas, não tratadas (NaOH) ($P=0,0027$) ou tratadas com hemina ($P=0,0023$), secretaram maiores concentrações de MIF se comparadas às células não infectadas nas mesmas condições experimentais (Figura 7A). Em paralelo, ao serem analisadas quanto à secreção desta citocina, células BeWo não demonstraram produção detectável de MIF em quaisquer condições avaliadas.

Ao serem investigadas em relação à secreção de IL-6 (Figura 7B), células BeWo ($P<0,0001$) e HTR-8/SVneo ($P<0,0001$) infectadas e tratadas com hemina apresentaram níveis de produção significativamente maiores para esta citocina, quando comparadas, de maneira respectiva, às suas linhagens também infectadas, mas não tratadas com a porfirina (NaOH). Além disso, o próprio estímulo com hemina em células HTR-8/SVneo não infectadas foi capaz de elevar a secreção de IL-6, de forma significativa ($P=0,0434$). Na presença do parasito, células HTR-8/SVneo não tratadas (NaOH) aumentaram consideravelmente a produção desta citocina ($P<0,0001$). Este mesmo fenômeno se mostrou mais acentuado quando esta linhagem celular foi exposta à indução de HO-1, visto que células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com hemina demonstraram maior secreção de IL-6 ($P<0,0001$) em relação às células tratadas, mas não infectadas por *T. gondii*. Quando não infectadas e estimuladas ou não com hemina, células BeWo não demonstraram produção de níveis detectáveis de IL-6, no entanto, quando infectadas, e posteriormente estimuladas ($P<0,0001$) ou não ($P<0,0001$) com a porfirina, esta linhagem celular apresentou maior produção de IL-6. Além disso, frente ($P=0,0002$) ou não ($P<0,0001$) à infecção por *T. gondii*, células HTR-8/SVneo não tratadas (NaOH) demonstraram maior produção de IL-6 que células BeWo nas mesmas condições, e quando estimuladas com hemina, a linhagem HTR-8/SVneo infectada ($P<0,0001$) ou não ($P=0,0122$) produziu, de forma significativa, maiores quantidades desta citocina que células BeWo analisadas nas mesmas condições experimentais.

Em relação à produção de IL-8 (Figura 7C), células BeWo infectadas, tratadas ($P=0,0275$) ou não ($P=0,0091$) com hemina apresentaram produção significativamente maior desta citocina quando comparadas às células não infectadas, nas mesmas condições. Além disso, células BeWo ($P=0,0004$) e HTR-8/SVneo ($P=0,0076$) infectadas e tratadas com hemina apresentaram maiores índices de IL-8 que as respectivas linhagens celulares também infectadas, mas não estimuladas com a porfirina (NaOH). Quando infectadas por *T. gondii* e tratadas com hemina, células HTR-8/SVneo produziram consideravelmente maiores concentrações de IL-8 ($P=0,0260$) que células tratadas com hemina mas não infectadas. De forma comparativa entre as linhagens celulares, células HTR-8/SVneo não infectadas, tratadas ($P=0,0275$) ou não ($P=0,0121$) com hemina, ou infectadas, estimuladas ($P=0,0022$) ou não ($P<0,0001$) com a porfirina, secretaram quantidades significativamente maiores de IL-8, quando comparadas às células BeWo nestas respectivas condições experimentais.

Embora também tenham sido investigadas quanto às secreções de IL-10 e TNF, células BeWo e HTR-8/SVneo não demonstram produções detectáveis destas citocinas, em quaisquer condições experimentais aqui avaliadas (dados não mostrados).

Portanto, os dados apresentados revelam que, em infecção pelo parasito, associada, ou não, com o tratamento com hemina, estas linhagens de trofoblasto viloso e extraviloso aumentam suas secreções de MIF, IL-6 e IL-8, enquanto citocinas envolvidas com a fisiologia destas células, com as funções de HO-1 e com os mecanismos de resposta imune frente à infecção por *T. gondii*.

Figura 7

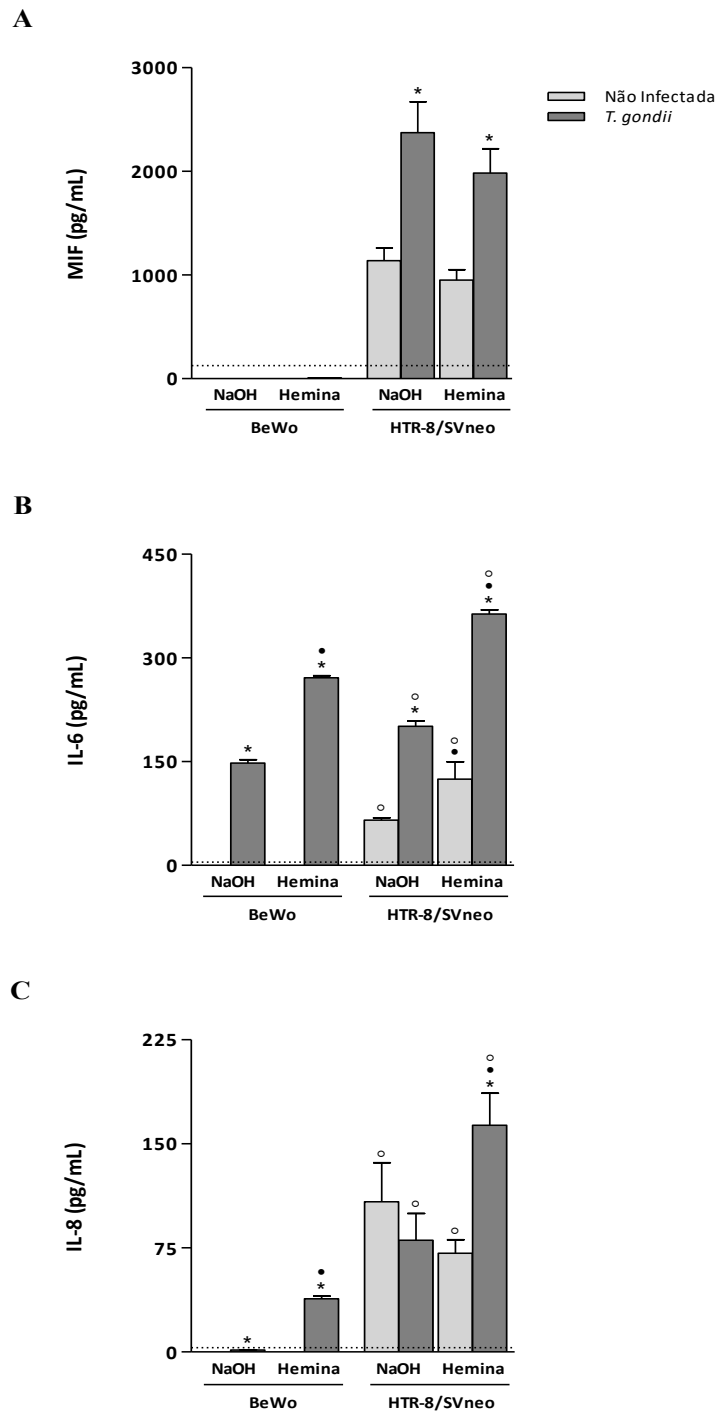


Figura 7. Produção de citocinas por células BeWo e HTR-8/SVneo. Os níveis de secreção das citocinas (A) MIF, (B) IL-6 e (C) IL-8, presentes nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo expostas as diferentes condições experimentais descritas, foram mensurados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados obtidos foram convertidos em pg/mL com base na respectiva curva padrão de referência de cada citocina recombinante. Os dados representam a média \pm SEM de dois experimentos independentes realizados em replicatas de 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (*) (°) (°). (A e B) Teste t de Student; (C) Teste de Mann-Whitney. (*) Comparação entre células infectadas e não infectadas, dentro da mesma linhagem e tratamento; (°) Comparação entre células tratadas com hemina e não tratadas, dentro da mesma linhagem e condição de infecção, ou não; (°) Comparação entre as linhagens celulares, dentro das mesmas condições de infecção e tratamento, ou não. As linhas pontilhadas (---), adjacentes ao eixo “x” (eixo das abscissas) dos gráficos, demarcam os limites de detecção para cada citocina mensurada.

5.7. O mecanismo dependente da produção de óxido nítrico (NO) não atua em células BeWo e HTR-8/SVneo

Com o objetivo final de se avaliar a produção de óxido nítrico (NO), a presença de nitrito (NO_2^-), enquanto metabólito indicativo de sua produção, foi avaliada nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo, frente à infecção por *T. gondii* e/ou como resultado da indução de HO-1 por hemina. Os resultados observados indicam que ambas as linhagens celulares não produziram níveis detectáveis de nitrito em quaisquer condições avaliadas (dados não mostrados), incluindo células não infectadas e não tratadas, sugerindo que NO não tenha ação efetiva nestas células no contexto da infecção e atuação de HO-1.

6. DISCUSSÃO

O trofoblasto representa uma população celular placentária, de origem embrionária/fetal, capaz de contribuir com importantes adaptações aos mecanismos de resposta imunológica materna, culminando em uma aceitação e sobrevivência do conceito em desenvolvimento (ENTRICAN, 2002; MAKRIGIANNAKIS et al., 2008; MOR et al., 2011). Em suas progressivas etapas de diferenciação, o trofoblasto possibilita o surgimento de importantes tipos celulares com características funcionais particulares e distintos perfis de susceptibilidade à infecção por patógenos oportunistas, como *T. gondii* (ABBASI et al., 2003; ORTIZ-ALEGRÍA et al., 2010; CARLIER et al., 2012; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012; ROBBINS et al., 2012; MCCONKEY et al., 2016; ARORA et al., 2017; ANDER et al., 2018).

Em especial, as células trofoblásticas vilosas e extravilosas humanas se utilizam de importantes mecanismos que garantem a homeostase do microambiente placentário, no qual a expressão e a atividade de HO-1 possuem relevância (BILBAN et al., 2009; LEVYTSKA et al., 2013). Na mesma proporção em que demonstra ser importante ao funcionamento do trofoblasto, HO-1 é capaz de contribuir na resposta imune contra patógenos (WEGIEL; HAUSER; OTTERBEIN, 2015), especialmente durante a gestação (WOUDWYK et al., 2012). A capacidade citoprotetora conferida pela indução desta enzima foi relevante ao controle da toxoplasmose em infecção experimental de camundongos (ARAUJO et al., 2013). Entretanto, ao verificarmos a inexistência de dados concretos acerca de uma possível participação de HO-1 na infecção do trofoblasto humano por *T. gondii*, nós investigamos esta hipótese ao avaliarmos a influência exercida pela indução desta enzima, através do tratamento com hemina, na infecção de células trofoblásticas humanas vilosas BeWo e extravilosas HTR-8/SVneo, por este parasito.

Inicialmente, a viabilidade destas linhagens celulares frente ao estímulo com hemina, utilizada neste estudo com função análoga à heme, foi avaliada a fim de se escolher de uma dose específica, com menor toxicidade às células, para, posteriormente, empregá-la nos experimentos que se seguiram. De modo geral, os resultados obtidos pelo ensaio de MTT demonstram que ambas as células apresentaram reduções em suas viabilidades celulares quando estimuladas com hemina. Apesar deste fato, a linhagem BeWo se mostrou mais resistente aos tratamentos com este fármaco em relação às células HTR-8/SVneo, igualmente analisadas. Quando tratadas com concentrações crescentes de hemina, e avaliadas quanto à toxicidade deste composto, ambas as linhagens demonstraram queda da porcentagem total de viabilidade, à medida que as doses de tratamento foram progressivamente aumentadas. Neste

sentido, células BeWo tiveram sua viabilidade reduzida apenas nas doses de 100 e 200 μ M de heme, ao passo que o efeito de toxicidade demonstrou ser mais amplo em células HTR-8/SVneo, as quais tiveram redução de sua viabilidade em todas as concentrações testadas.

Estudos prévios, baseados em análises genômicas e proteômicas, demonstraram que células BeWo e HTR-8/SVneo apresentam importantes diferenças entre si, as quais justificam suas utilizações diferenciadas enquanto modelos de citotrofoblasto humano viloso (CTv) e extraviloso (CTe), respectivamente (BILBAN et al., 2010; SZKLANNA et al., 2017). Enquanto células BeWo expressam marcadores proteicos que as classificam como CTv de natureza epitelial (MALDONADO-ESTRADA et al., 2004), a linhagem HTR-8/SVneo sintetiza fatores proteicos que as define como CTe de fenótipo mesenquimal (ABOU-KHEIR et al., 2017). Juntas, as distinções evidenciadas entre estas linhagens de trofoblasto podem justificar, ainda que parcialmente, as diferentes tolerâncias apresentadas por células BeWo e HTR-8/SVneo frente aos tratamentos com heme. Além disso, corroborando aos nossos resultados, dados anteriores verificaram padrões similares de toxicidade desencadeada pela heme em células BeWo, cujos efeitos estiveram associados com o consequente aumento dos índices de morte celular por apoptose nesta linhagem (LIU; HASSANA; STILES, 2016).

Assim como a heme, diferentes moléculas estimuladoras são capazes de induzir à expressão de HO-1 (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Com base neste fato, observou-se que, quando células epiteliais da retina humana (ARPE-19) foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cuja dose de 500 μ M aumentou os níveis de mRNA e de expressão proteica de HO-1, a viabilidade celular foi reduzida a 50%, mas progressivamente recuperada à medida em que células tratadas foram infectadas com quantidades crescentes de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, demonstrando mecanismos utilizados pelo parasito para aumentar a sobrevivência de sua célula hospedeira (CHOI et al., 2011). Desta maneira, a fim de avaliarmos o efeito de heme na susceptibilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*, nós decidimos utilizar as mesmas doses da porfirina empregadas no ensaio de MTT, para a análise de sua influência sobre os índices de parasitismo, tendo como base a evidência de que a infecção, por si só, poderia recuperar nessas linhagens celulares, a porcentagem de redução gerada na viabilidade celular, decorrente do estímulo com heme.

Logo, ao avaliarmos um possível papel da indução de HO-1 sobre as taxas de replicação do parasito, observamos que, em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com heme, os índices de proliferação de *T. gondii* foram elevados, significativamente. Na linhagem BeWo este efeito foi verificado em células tratadas com o indutor nas doses de 80, 100 ou 200 μ M, ao passo que na linhagem HTR-8/SVneo, o fenômeno foi evidenciado quando as células

foram estimuladas com a porfirina, a 40, 80 ou 100 μ M. Constatamos também que o parasitismo em células BeWo estimuladas com hemina a 10 e 40 μ M, e em células HTR-8/SVneo, na dose de 10 μ M, não sofreu alterações em suas taxas, possivelmente em virtude de estas menores doses não terem refletido em uma eficiência significativa na indução da enzima, em oposição às mais elevadas, eficazes em beneficiar a replicação do parasito. Além disso, especificamente em células HTR-8/SVneo, a dose de 200 μ M de hemina não aumentou a proliferação de *T. gondii*, fato este que pode ter vínculo com um provável comprometimento celular, em virtude do potencial pró-oxidante que a heme apresenta a variados tipos celulares, quando em excesso (WEGIEL; HAUSER; OTTERBEIN, 2015), impedindo desta forma, a regulação positiva dos prováveis mecanismos celulares alterados em favor do parasitismo.

Em investigações anteriores de nosso grupo, Araujo e colaboradores (2013) verificaram um efeito oposto exercido pelo tratamento com hemina em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa ME49 de *T. gondii*, os quais apresentaram significativa redução da carga parasitária intestinal frente ao estímulo com a porfirina, de maneira dependente da expressão da enzima IDO. Este mesmo estudo ainda verificou que o tratamento prévio de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* com hemina, não alterou sua posterior proliferação em células HeLa, demonstrando que o tratamento com esta porfirina para a indução de HO-1, atua a nível do hospedeiro (ARAUJO et al., 2013). É plausível supor, que as divergências entre a indução *in vitro* da proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo, e este controle do parasitismo *in vivo*, ambos exercidos por hemina, sejam decorrentes das diferenças entre estes modelos de estudo e das distinções existentes entre os mecanismos de resposta imune à infecção pelo parasito, presentes em humanos e murinos (SHER; TOSH; JANKOVIC, 2017). Pode-se supor ainda que as diferentes cepas de *T. gondii* reflitam pelo hospedeiro, comportamentos diferenciais frente à indução de HO-1 por hemina, uma vez que, conforme dados anteriores, as taxas de infecção de macrófagos murinos (células RAW 264.7), também pela cepa RH de *T. gondii*, foram aumentadas significativamente pelo tratamento destas células com a porfirina (ARAUJO, 2011), estando de acordo com os nossos achados para células BeWo e HTR-8/SVneo.

Sabe-se que HO-1 desempenha importante papel na sobrevivência celular, fato confirmado por um estudo prévio no qual a enzima atuou como um fator anti-apoptótico em células endoteliais murinas (2F-2B) e bovinas (BAECs), através do efeito protetor desempenhado pelo CO, enquanto um dos subprodutos de sua atividade, agindo por meio da ativação da via de sinalização mediada por p38-MAPK (BROUARD et al., 2000). Além disso, foi verificado anteriormente que a cepa RH de *T. gondii*, de elevada virulência,

demonstrou habilidade em inibir a morte celular por apoptose de suas células hospedeiras, por induzir à redução da expressão de seus fatores pró-apoptóticos, e elevar a síntese proteínas anti-apoptóticas nas mesmas (HWANG et al., 2010; CHOI et al., 2011). Especialmente em células BeWo, os achados de Angeloni e colaboradores (2013) estabeleceram que a cepa ME49 de *T. gondii* esteve relacionada a um aumento dos índices morte celular por apoptose nestas células, de forma dependente da produção de citocinas pró-inflamatórias e da elevada expressão do marcador celular Fas/CD95, enquanto receptor para a indução de morte por apoptose. Por outro lado, a cepa RH de *T. gondii* foi capaz de bloquear a apoptose em células BeWo, neste caso em associação à secreção de citocinas anti-inflamatórias e aos maiores índices de fosforilação da MAPK do tipo ERK1/2 (ANGELONI et al., 2013).

Ao considerarmos o papel anti-apoptótico desempenhado por HO-1, podemos especular que o estímulo com hemina, para a indução da enzima, somado à capacidade inerente à cepa RH do parasito de bloquear a apoptose no trofoblasto, tenha proporcionado um microambiente adequado para o aumento da proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo, através do bloqueio da apoptose e consequente recuperação da sobrevivência celular nestas linhagens, inferida anteriormente. Todavia, para a confirmação do real efeito anti-apoptótico exercido por HO-1 em células BeWo e HTR-8/SVneo, que beneficiaria a replicação do parasito, investigações adicionais serão necessárias.

Ao verificarmos, portanto, que o tratamento de células BeWo e HTR-8/SVneo com hemina induziu um aumento nos índices de replicação do parasito, nós buscamos, em seguida, investigar quais seriam os possíveis efeitos gerados pela infecção, bem como pelo tratamento com hemina, na expressão proteica e na atividade funcional de HO-1.

Bilban e colaboradores (2009) foram os pioneiros em analisar a atuação de HO-1 em células BeWo e HTR-8/SVneo, simultaneamente, cuja expressão esteve associada com uma redução dos perfis de motilidade migratória destas células, desencadeada pela regulação positiva do receptor nuclear PPAR- γ . Neste estudo, foi demonstrado também que células BeWo expressaram níveis detectáveis e aumentados de HO-1 em comparação às células HTR-8/SVneo, nas quais, em condições normais, a expressão de HO-1 foi indetectável. Em virtude destes comportamentos por células BeWo e HTR-8/SVneo, a investigação acerca da influência da enzima na motilidade do trofoblasto, só se fez possível, no trabalho citado, pela realização de um “*knockdown*” com perda de função para HO-1 em células BeWo, e pelo “*knockin*” com ganho de função em células HTR-8/SVneo (BILBAN et al., 2009).

Ao avaliarmos a expressão da enzima por ambas as linhagens, verificamos que, quando não tratadas com hemina, células BeWo infectadas reduziram seus níveis de expressão de

HO-1, quando comparadas às células não infectadas, enquanto que células HTR-8/SVneo infectadas, apenas apresentaram uma tendência de redução desta expressão. De forma similar aos nossos resultados para a linhagem BeWo, as células ARPE-19, que tiveram a expressão de HO-1 induzida por H₂O₂, também reduziram a expressão da enzima frente à infecção por *T. gondii*, como um mecanismo de sobrevivência do próprio parasito em um contexto de estresse oxidativo (CHOI et al., 2011). Contudo, de forma distinta aos nossos achados, o número de células com expressão positiva para HO-1 (HO-1⁺) encontradas nos pulmões de animais C57BL/6 infectados por *T. gondii* foi superior ao encontrado no mesmo órgão de animais não infectados (ARAÚJO et al., 2013). Novamente, estas relações estabelecidas com os trabalhos citados sugerem que, ao menos em células BeWo, os mecanismos desencadeados por HO-1 que possam estar vinculados ao aumento do parasitismo por *T. gondii* e à redução de sua expressão frente à infecção, sejam distintos daqueles desencadeados no modelo murino de susceptibilidade ao parasito.

As investigações desenvolvidas por Tachibana e colaboradores a respeito do papel de HO-1 na infecção de células trofoblásticas gigantes (TG) murinas por *B. abortus* (2008) e por *L. monocytogenes* (2011), estão de acordo com nossos dados em células BeWo infectadas por *T. gondii*. Nos trabalhos citados, a presença de HO-1 conferiu um papel benéfico às células TG murinas, bem como às fêmeas de camundongos gestantes, na proteção contra a morte celular e aborto, respectivamente, decorrentes de tais infecções bacterianas. Além disso, quando infectadas, estas células reduziram seus níveis de expressão de HO-1, em função da patogenicidade desenvolvida por estas bactérias (TACHIBANA et al., 2008; 2011). De acordo com o exposto acima e tendo em vista o papel citoprotetor desempenhado pela enzima, uma hipótese seria que a redução da expressão de HO-1 por células BeWo na presença de *T. gondii*, represente um mecanismo desenvolvido pelo próprio trofoblasto em resposta à infecção, uma vez que quando estimuladas com hemina, os índices de parasitismo em células BeWo e HTR-8/SVneo aumentaram de forma significativa, demonstrando que *T. gondii* é capaz de se utilizar de HO-1 e de seus efeitos citoprotetores, de algum modo, a seu favor.

Ao serem tratadas com hemina, células BeWo aumentaram de forma considerável a expressão de HO-1, independente da infecção, ao passo que nesta mesma condição de estímulo, células HTR-8/SVneo não alteraram seus níveis de expressão para a enzima, sendo que, quando relacionados com células BeWo tratadas, os índices de expressão de HO-1 observados em células HTR-8/SVneo expostas à hemina foram expressivamente menores. Foi demonstrado previamente que o trofoblasto extraviloso (CTe) apresentou quantidades expressivas de HO-2, na medida em que ao ser avaliado quanto à expressão de HO-1, este

tipo celular demonstrou baixos níveis de detecção para esta isoforma induzível (BARBER et al., 2001). Diante do fato de que, em condições normais, células HTR-8/SVneo não expressam HO-1 (BILBAN et al., 2009), embora a tenhamos detectado em baixos níveis, pode-se sugerir que nesta linhagem celular, tanto a infecção quanto os efeitos gerados pelo tratamento com hemina não tenham atuado a nível da expressão de HO-1, por provavelmente HO-2 ser a isoforma predominante em células de CTe, como HTR-8/SVneo. Esta hipótese pode ser sustentada por evidências anteriores de que células HTR-8/SVneo, em condições normais ou de hiperóxia (20% de O₂), expressaram maiores níveis HO-2 em relação a HO-1 (APPLETON et al., 2003). Portanto, assim como realizadas para HO-1, novas investigações acerca do papel de HO-2 na infecção de células HTR-8/SVneo por *T. gondii*, são necessárias.

Posteriormente, ao avaliarmos o perfil de atividade da enzima relacionado à expressão da isoforma HO-1 em ambas as linhagens, verificamos que em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas o tratamento com hemina elevou os índices de atividade da enzima, baseados na produção de bilirrubina após o estímulo das células com a porfirina. Em seguida, quando analisadas em parâmetros comparativos, células HTR-8/SVneo apresentaram menores taxas de atividade de HO-1, quando relacionadas às células BeWo em todas as condições de mensuração de bilirrubina. Por fim, ao serem avaliadas quanto ao efeito específico gerado pela infecção, a atividade de HO-1, validada pela produção de bilirrubina, foi reduzida em células BeWo expostas à *T. gondii*, e inalterada em células HTR-8/SVneo também infectadas.

Embora em um distinto contexto de investigação, Appleton e colaboradores (2003) também verificaram que a atividade funcional da enzima não foi alterada em células HTR-8/SVneo frente às diferentes tensões de O₂, fazendo-nos supor que além da baixa e pouco alterada expressão de HO-1 por esta linhagem, esta isoforma possa também desempenhar uma reduzida função catalítica neste modelo celular, confirmada por nossos achados de que estas células demonstraram menor quantidade de bilirrubina total secretada, quando comparadas às células BeWo. Contudo, de modo distinto deste nosso resultado, Araujo e colaboradores (2013) evidenciaram através da dosagem dos níveis séricos de bilirrubina, em camundongos BALB/c e C57BL/6, que a atividade de HO-1 foi aumentada na presença de *T. gondii*, associada, ou não, com o tratamento por hemina, o qual foi capaz de reduzir o parasitismo pulmonar, em ambas as linhagens de camundongos, e intestinal, nos animais C57BL/6. Com base na mesma hipótese justificativa para a ação diferencial de hemina sobre o parasitismo, estas diferenças observadas acerca do comportamento funcional de HO-1 provavelmente estão vinculadas aos distintos mecanismos de controle da infecção por *T. gondii*, tanto entre modelos *in vitro* e *in vivo*, quanto entre humanos e camundongos. Além disso, a expressão e a

atividade de HO-1 podem se comportar de maneiras distintas, levando a consequências benéficas ou prejudiciais, dependendo do contexto de exposição infecciosa ao qual o hospedeiro está exposto (CHUNG; HALL; PERELLA, 2009; RIQUELME et al., 2016).

Temos evidenciado até o momento que HO-1 se comporta de diferentes maneiras em células BeWo e HTR-8/SVneo, refletindo as diferenças existentes já estabelecidas entre estes modelos de trofoblasto viloso e extraviloso, respectivamente (BILBAN et al., 2010; SZKLANNA et al., 2017). No contexto em que a infecção por *T. gondii* e a indução enzimática de HO-1 por hemina influenciaram nos padrões de expressão e atividade de HO-1 por células BeWo, em células HTR-8/SVneo estes mesmos fatores não alteraram expressivamente o padrão funcional desta enzima. Apesar destas constatações, o estímulo com hemina beneficiou a proliferação de *T. gondii* em ambas as células, gerando novos questionamentos acerca dos prováveis mecanismos que estariam envolvidos com este comportamento distinto de HO-1, entre estas linhagens celulares.

Sabe-se que o sucesso inicial da infecção por *T. gondii*, em diferentes modelos celulares, está associada à ativação imediata e diferencial das proteínas de sinalização pertencentes à via das MAPK (VALÈRE et al., 2003; DENKERS et al., 2004; KIM et al., 2006). Foi mostrado que, em infecção de macrófagos murinos BMDMs, a cepa RH de *T. gondii* ativou a fosforilação das MAPK, p38-MAPK, JNK e ERK1/2 dentro de 10 a 20 minutos, sendo que, em seguida, ocorreram as desfosforilações de p38-MAPK e ERK1/2, dentro de 30 minutos, e de JNK, em 60 minutos (KIM; BUTCHER; DENKERS, 2004). Além disso, em infecção também pela cepa RH do parasito, células HeLa apresentaram fosforilação elevada de p38-MAPK às 6 horas, sendo que à 1 hora, JNK e ERK1/2 também foram ativadas, mas seguidamente desfosforiladas às 6 horas de exposição ao parasito (KIM et al., 2006). Uma vez que a expressão e atividade de HO-1 também se utilizam dos mecanismos intracelulares mediados pelas MAPK, para atuarem em variados contextos biológicos de maneira “upstream” e/ou “downstream” (RYTER; ALAM; CHOI, 2006), nós nos propusemos a avaliar a ativação desta via em células BeWo e HTR-8/SVneo, pela detecção da fosforilação de seus componentes canônicos, as proteínas p38-MAPK, JNK e ERK1/2.

Nossos dados revelaram que, quando infectadas pelo parasito e não tratadas com hemina, células BeWo e HTR-8/SVneo não alteraram de forma significativa os índices de ativação de JNK e ERK1/2, contudo, ambas as linhagens infectadas demonstraram reduções na fosforilação de p38-MAPK, em relação às células não infectadas. Estudos anteriores demonstraram que a participação de p38-MAPK é relevante à proliferação de *T. gondii* em fibroblastos humanos (HFF) (WEI et al., 2002), portando-se como alvo estratégico da evasão

desenvolvida pelo parasito, mas participando também na resposta imune celular contra a infecção (MASON et al., 2004; KIM et al., 2005; BRAUN et al., 2013).

Hashino e colaboradores (2015) demonstraram que a infecção de células TG murinas por *L. monocytogenes* esteve associada à desfosforilação das três classes de MAPK hospedeiras, JNK (de 1 às 6 horas), p38 e ERK1/2 (0,5 às 6 horas), após a infecção, sendo que neste contexto, a redução da expressão de HO-1, também frente à infecção bacteriana, esteve ligada à desativação específica de JNK e ERK1/2 nestas células. Monócitos humanos THP1 infectados com a cepa RH de *T. gondii* mostraram uma fosforilação precoce dos três tipos de MAPK aos 5 minutos de infecção, sendo este efeito expressivo no tempo máximo de 60 minutos com posterior decaimento da fosforilação a partir de 2 horas, para p38-MAPK e JNK especificamente (VALÈRE et al., 2003). Foi demonstrado anteriormente que o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), cepa RH, não alterou a fosforilação de ERK1/2 em células BeWo observadas 24 horas após o tratamento (BARBOSA et al., 2014). Em nosso trabalho a desfosforilação evidente de p38-MAPK às 24 horas de infecção pelo parasito, em ambas as linhagens celulares, pode estar envolvida com a menor expressão de HO-1, especialmente em células BeWo. Apesar de não termos observado desfosforilação significativa de JNK e ERK1/2 nestas células, não podemos descartar a participação dessas MAPK no contexto da atuação de HO-1 no trofoblasto, devido ao tempo de observação posterior à infecção pelo parasito, aqui empregado. Embora se trate de um microambiente distinto ao abordado por nosso estudo, os achados estabelecidos por Choi e colaboradores (2011) corroboram aos nossos resultados, uma vez que ao investigarem a infecção das células epiteliais retinianas ARPE-19 por *T. gondii*, estes autores concluíram que a queda na expressão de HO-1 frente ao parasitismo foi dependente da fosforilação reduzida de p38-MAPK, demonstrando, de forma importante, que atuação de HO-1 é dependente da ativação desta via de sinalização, especialmente na presença de *T. gondii*.

Verificamos ainda que, quando infectadas, células BeWo tratadas com hemina elevaram de forma significativa a fosforilação de p38-MAPK, ao passo que células HTR-8/SVneo expostas às mesmas condições demonstraram a capacidade de ativar a fosforilação de outra MAPK, neste caso, a JNK. Previamente, Lee e Chau (2002) elucidaram que os efeitos anti-inflamatórios desencadeados por IL-10 em macrófagos murinos primários são mediados pela atividade citoprotetora de HO-1. Neste estudo, constatou-se também que a indução da expressão de HO-1 por IL-10, em linhagem de macrófagos murinos (células J774), foi dependente da fosforilação de p38-MAPK (LEE; CHAU, 2002). Posteriormente, foi demonstrado que a indução de HO-1 pelo peptídeo natriurético atrial (ANP) em células

endoteliais humanas (HUVEC), foi dependente da ativação de ERK1/2 e de JNK associada à proteína ativadora-1 (JNK/AP-1), enquanto fator de transcrição desta última quinase (KIEMER et al., 2003). É importante salientar que as verificações acima citadas, relatam um papel “*usptream*” da via das MAPK sobre a expressão de HO-1, embora, por outro lado, as quinases pertencentes a esta via de sinalização também possam ser requeridas para atuação fisiológica dos subprodutos provenientes da atuação da enzima, como o CO, de maneira que a ativação das MAPK pode também se configurar como “*downstream*” em relação à atividade de HO-1 (BROUARD et al., 2000; RYTER; ALAM; CHOI, 2006).

Com base nestes fatos, os dados obtidos por nós sugerem que a indução de HO-1 por hemina esteja induzindo a fosforilação de p38-MAPK em células BeWo, e de JNK em células HTR-8/SVneo, embora tenhamos detectado anteriormente que, nesta última linhagem celular, a expressão e atividade da enzima não foram significativas. Desta maneira, em virtude de tais vias serem importantes à sobrevivência do parasito e à atividade de HO-1, ao recrutá-las para sua atuação, o tratamento com hemina demonstrou ser favorável à proliferação de *T. gondii*.

No presente trabalho, a participação de ERK1/2 foi também avaliada, por serem MAPKs de importante papel na indução de HO-1 (RYTER; ALAM; CHOI, 2006) e na infecção por *T. gondii* (DENKERS et al., 2004; KIM et al., 2006). Até o presente momento, dados experimentais acerca da atuação de alguma das três proteínas MAPKs, na infecção de células HTR-8/SVneo pelo parasito, são inexistentes. Todavia, foi verificado em células BeWo que o bloqueio da via de sinalização que resulta na fosforilação de ERK1/2, através do fármaco inibidor PD98059, reduziu os índices de proliferação dos taquizoítas RH de *T. gondii*, sugerindo que a atuação desta via em células trofoblásticas vilosas seja importante à sobrevivência do parasito (BARBOSA et al., 2014). Observou-se ainda que, durante a infecção por esta cepa do parasito, a qual possui capacidade inibidora da morte celular por apoptose em células BeWo, a fosforilação de ERK1/2 se comportou como um evento anti-apoptótico nesta linhagem celular, uma vez que a mesma foi aumentada significativamente de 2 a 24 horas após a infecção (ANGELONI et al., 2013). Ao avaliarmos a ativação de ERK1/2 em nosso contexto, obtivemos os dados de que o padrão de ativação desta quinase, por células BeWo e HTR-8/SVneo, não se alterou nas diferentes condições analisadas, tanto em infecção por *T. gondii* quanto frente ao estímulo com hemina. Dados de um trabalho anterior demonstram que hemina induz e sustenta a fosforilação de ERK1/2 em células endoteliais HUVEC, levando à consequente expressão de HO-1 por estas células (CHEN et al., 2007).

De maneira contrária às evidências apresentadas, podemos sugerir que a ativação ERK1/2 não tenha uma contribuição evidente nos mecanismos de atuação por HO-1 em nosso

contexto, ao se levar em consideração que as fosforilações de p38-MAPK e JNK mostraram maior envolvimento com o papel da enzima em células BeWo e HTR-8/SVneo, respectivamente, apesar de se ter o conhecimento acerca da importância de ERK1/2 na infecção de células BeWo por *T. gondii* (ANGELONI et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

A expressão e a atividade de HO-1 também demonstram estar associadas aos mecanismos de resposta imunológica, sendo capazes de regular os perfis de produção e secreção de fatores pró e anti-inflamatórios (reguladores), a depender dos tipos de injúrias, de natureza infecciosa ou não, as quais células e tecidos são submetidos (KAPTURCZAK et al., 2004; RYTER; ALAM; CHOI, 2006; MA et al., 2007; HUALIN et al., 2011). Durante as fases do período gestacional, as isoformas de HO, especialmente HO-1 por seu caráter induzível, são expressas pelo trofoblasto a fim contribuírem para a regulação das reações imunes no microambiente placentário, garantindo um “*status*” de tolerância imunológica diferencial, benéfica à gestação (SOLLWEDEL et al., 2005; ZENCLUSSEN et al., 2007). Importantes estudos prévios estabeleceram que, frente à infecção por *T. gondii*, células BeWo e HTR-8/SVneo são capazes de alterar seu padrão de secreção de citocinas, importantes ao funcionamento do trofoblasto (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016), na tentativa de controlarem a replicação do parasito e amenizarem os efeitos gerados pela infecção (FRANCO et al., 2011; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; GUIRELLI et al., 2015; SILVA et al., 2017). Com o intuito de determinarmos quais possíveis citocinas relacionadas à infecção destas células por *T. gondii* estariam associadas à expressão e atividade de HO-1, por nós evidenciadas, os níveis de secreção de MIF, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF por células BeWo e HTR-8/SVneo, expostas às diferentes condições experimentais, foram quantificados.

Previamente foi evidenciado que células BeWo elevaram a produção de MIF em resposta à infecção por *T. gondii*, e que a presença desta citocina esteve associada ao controle do parasitismo em monócitos humanos THP-1 (CASTRO et al., 2013). Entretanto, ao avaliarmos a produção de MIF por células BeWo infectadas ou não, e tratadas com hemina ou não, não obtivemos níveis detectáveis em sua secreção, sugerindo que esta citocina possa não estar associada às funções de HO-1 pelo trofoblasto. Além disso, em dados prévios, foi observado que a infecção por *T. gondii*, por si só, não gerou alteração significativa na produção de MIF pela linhagem BeWo, a qual só foi aumentada significativamente, pelo estímulo exógeno com prostaglandina E₂ (PGE₂), produto metabólico resultante da via de atuação desencadeada por MIF (BARBOSA et al., 2014). As evidências apresentadas nos dão suporte para a realização de novas análises experimentais, que possam esclarecer os motivos pelos quais tanto células BeWo infectadas quanto não infectadas não apresentaram secreção detectável de MIF. Sendo

assim, a não detecção de MIF em nossas investigações para células BeWo expostas à infecção por *T. gondii*, caracteriza nossos dados como controversos aos já consolidados na literatura.

Por outro lado, ao avaliarmos a produção desta citocina por células HTR-8/SVneo, um aumento expressivo de sua secreção em infecção por *T. gondii* foi observado, de modo independente ao tratamento com hemina. Guirelli e colaboradores (2015) verificaram que células HTR-8/SVneo infectadas pela cepa RH de *T. gondii*, e isentas de quaisquer estímulos, não apresentaram diferenças em suas concentrações de MIF quando comparadas às células não infectadas, o que caracteriza nosso resultado, observado nestes mesmos parâmetros, como contraditório. Entretanto, o trabalho citado se utilizou de um método alternativo conhecido por: assinatura de citocinas, capaz detectar populações celulares “baixo” ou “alto” produtoras de citocinas (SILVA et al., 2011). Através deste método foi demonstrado que células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii*, e estimuladas com meio condicionado (sobrenadante de cultivo celular) proveniente de macrófagos (diferenciados de monócitos THP-1) infectados pelo parasito, foi capaz de aumentar sua população alto secretora de diferentes citocinas, dentre elas MIF, como uma provável estratégia utilizada por esta cepa do parasito em bloquear a apoptose de células trofoblásticas extravilosas, em favor de sua sobrevivência (GUIRELLI et al., 2015). A partir destes fatos, conclui-se que novas investigações são necessárias para se determinar com exatidão por quais mecanismos células HTR-8/SVneo respondem à infecção por *T. gondii*, aumentando as concentrações de MIF secretadas, como evidenciado por nossos resultados, ou ampliando sua população celular alto produtora para esta citocina, como visto por Guirelli e colaboradores (2015).

Em outras importantes análises prévias, verificou-se que a produção de MIF por explantes de vilos placentários humanos de primeiro trimestre gestacional foi aumentada pelo estímulo com STAg (FERRO et al., 2008) e que, além disso, a secreção desta citocina e o controle do parasitismo pela mesma foram mais expressivos em vilos de primeiro trimestre, se comparados aos vilos coriônicos de terceiro trimestre (GOMES et al., 2011). Juntas, estas evidências suportam nosso dado acerca da maior produção de MIF por células HTR-8/SVneo quando em infecção por *T. gondii*. Embora não tenhamos detectado uma influência concreta exercida por hemina na produção de MIF em células HTR-8/SVneo, em outro contexto, o papel citoprotetor de HO-1 demonstrou reduzir a atividade inflamatória desempenhada por MIF, através da diminuição de sua produção em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e pelo controle da injúria pulmonar aguda induzida por endotoxina em camundongos BALB/c, nos quais a indução de HO-1 reduziu a inflamação mediada pela associação entre MIF e TLR4 (YIN et al., 2010).

Quando avaliada pelo presente estudo, a produção de IL-6 por células BeWo e HTR-8/SVneo se mostrou aumentada em infecção por *T. gondii*, estando de acordo com resultados obtidos anteriormente, os quais conferiram uma importância a esta citocina secretada pelo trofoblasto, para o controle do parasitismo (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; 2015; GUIRELLI et al., 2015). Na presença de *T. gondii* e ao serem estimuladas por hemina, células BeWo e HTR-8/SVneo elevaram a produção desta citocina em relação às células também infectadas e não tratadas, sugerindo que IL-6 esteja vinculada à atuação de HO-1. Por outro lado, o maior parasitismo verificado em células tratadas com hemina, possa também estar atuando positivamente na maior indução da produção desta citocina. Além disso, verificamos também que o próprio tratamento com hemina em células HTR-8/SVneo não infectadas, foi capaz de amplificar a liberação de IL-6, reforçando nossa hipótese de que, nestas células, a produção deste mediador possa ser desencadeada pela atuação de hemina.

Estudos anteriores demonstraram que IL-6 sintetizada por células BeWo se comportou como um fator pró-inflamatório para a redução da proliferação de *T. gondii* (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015). Entretanto, sabe-se que IL-6 atua de maneira pleiotrópica dependendo do contexto biológico em que está inserida, podendo se comportar como uma citocina de caráter pró ou anti-inflamatório (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003), especialmente no microambiente gestacional (DEALTRY; O'FARRELL; FERNANDEZ, 2000; ZENCLUSSEN et al., 2007). Além disso, considerando-se o papel anti-inflamatório desempenhado por HO-1, é plausível supor uma relação de interdependência entre a enzima e IL-6, sustentada tanto pelos resultados por nós obtidos, quanto por dados anteriores de que o estímulo com esta citocina foi capaz de induzir à expressão de HO-1 por macrófagos humanos diferenciados de monócitos (RICCHETTI; WILLIAMS; FOXWELL, 2004). Logo, podemos sugerir que a indução de HO-1 em células BeWo e HTR-8/SVneo tenha conferido a IL-6 um comportamento protetor à sobrevivência celular, possivelmente utilizado como mecanismo de evasão por *T. gondii*, na medida em que esteve relacionado com a elevação dos índices de proliferação do parasito nestas células. Contudo, é válido salientar que, frente à infecção por *T. gondii*, a produção de IL-6 deve ser bem controlada, visto que camundongos C57BL/6 deficientes em SOCS-3, e suas linhagens de neutrófilos e macrófagos, infectados com a cepa Prugniaud (PRU), foram susceptíveis à infecção pelo parasito, sendo que esta susceptibilidade esteve associada à alta produção de IL-6 como potente antagonista da produção de IL-12 (WHITMARSH et al., 2011).

De maneira semelhante a IL-6, quando células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* foram tratadas com hemina, os níveis de secreção de IL-8 foram também aumentados

em comparação com células infectadas, mas não estimuladas com a porfirina. Especialmente, a produção de IL-8 por células HTR-8/SVneo infectadas foi expressivamente maior frente ao estímulo com hemina, quando comparada à sua produção por estas células infectadas e não tratadas. Ainda nas condições analisadas, células HTR-8/SVneo produziram maiores níveis de IL-8 em relação às células BeWo, especialmente quando infectadas e tratadas.

Kim e colaboradores (2001) demonstraram que, na presença de *T. gondii*, células HeLa elevaram a produção da proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 e de IL-8, enquanto quimiocinas importantes ao recrutamento de células inflamatórias que exercem um controle da infecção pelo parasito. Além disso, observou-se que a produção de IL-8 por células decíduas estromais (DSCs), atuou em células BeWo amplificando seu potencial invasivo (RYU et al., 2017), fenômeno similar ao observado em células HTR-8/SVneo estimuladas de forma exógena com esta quimiocina (JOVANOVIĆ et al., 2010). Embora se tenham evidências de que HO-1 se comporte como um fator de regulação negativa da migração de células BeWo e HTR-8/SVneo (BILBAN et al., 2009), sabe-se que células de CTv estão particularmente envolvidas com os suprimentos metabólicos ao embrião/feto, enquanto que as células de CTe estão intimamente ligadas à placentação adequada, em virtude de sua ampla capacidade invasiva (ABOU-KHEIR et al., 2016). Neste sentido, podemos supor que o aumento da secreção de IL-8 por células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com hemina, remonte à uma possível estratégia utilizada por estas células, em resposta à elevação do parasitismo, para o recrutamento de células inflamatórias à interface materno-fetal com vistas ao controle da replicação de *T. gondii*. Apesar de possuírem fundamentos teóricos, investigações futuras serão necessárias para avaliar e confirmar as hipóteses aqui discutidas.

Embora as citocinas IL-10 e TNF sejam relevantes aos diferentes contextos inflamatórios em que HO-1 está inserida (TAMION et al., 1999; LEE; CHAU, 2002; RICCHETTI; WILLIAMS; FOXWELL, 2004), bem como aos mecanismos de resposta imune à infecção por *T. gondii* (DENKERS; GAZZINELLI, 1998), no presente estudo, não detectamos a produção destes mediadores por células BeWo e HTR-8/SVneo, nas condições experimentais avaliadas, o que está de acordo com verificações anteriores de que estas linhagens celulares normalmente produzem ínfimas ou indetectáveis concentrações destes mediadores (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; GUIRELLI et al., 2015).

Durante a infecção por *T. gondii*, a síntese de óxido nítrico (NO) por células inflamatórias representa um importante mecanismo de resistência ativado pela resposta imune do hospedeiro, a fim de controlar a infecção pelo parasito (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997; YAROVINSKY, 2014; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018). Além disso, a

disponibilidade de NO é capaz de estabelecer uma relação de interdependência com a expressão de HO-1, para a garantia da proteção celular em diferentes contextos de injúria e inflamação (BOUTON; DEMPLE, 2000; MORSE; CHOI, 2005; PAE et al., 2010). Logo, a fim de avaliarmos uma possível produção de NO por células BeWo e HTR-8/SVneo, nas condições de infecção por *T. gondii* e de indução de HO-1, os níveis de nitrito, enquanto subproduto da conversão química deste mediador, foram quantificados.

Finalmente, nossas análises revelaram que células BeWo e HTR-8/SVneo não apresentaram níveis detectáveis de nitrito, em quaisquer condições avaliadas, demonstrando que, possivelmente, nestas linhagens celulares a síntese de NO não está envolvida nos mecanismos que acarretaram no aumento do parasitismo decorrente da indução de HO-1. Embora dados de um estudo prévio tenham evidenciado a expressão de sua sintase induzível (iNOS) por células trofoblásticas humanas (HAMBARTSOUMIAN; SRIVASTAVA; SEIBEL, 2001), a não produção de NO por nós evidenciada corrobora com evidências já estabelecidas de que este mediador não esteve presente em células BeWo infectadas por *T. gondii* (PFAFF et al., 2005).

No presente estudo, ao investigarmos a participação funcional de HO-1, na infecção de células trofoblásticas humanas vilosas e extravilosas humanas por *T. gondii*, reunimos evidências de que o tratamento com hemina favoreceu a proliferação do parasito em ambas as populações celulares, embora tenha exercido este papel, através de mecanismos parcialmente distintos entre estes tipos de células trofoblásticas. Na linhagem BeWo, o estímulo com hemina foi capaz de aumentar o parasitismo, envolvendo alterações na expressão e atividade da enzima, possivelmente mediadas pela via de sinalização sustentada por p38-MAPK. Na linhagem HTR-8/SVneo, hemina também foi capaz de favorecer o parasitismo, de forma supostamente associada ao recrutamento da sinalização mediada pela MAPK do tipo JNK, embora de forma diferenciada à outra linhagem trofoblástica avaliada, estas células extravilosas não tenham alterado a expressão e atividade de HO-1 em resposta à infecção.

Os resultados aqui apresentados podem ser considerados como contribuições iniciais ao entendimento da influência de HO-1 na infecção congênita causada por *T. gondii*. Todavia, a fim de se alcançar novas alternativas preventivas e/ou terapêuticas para o tratamento da toxoplasmose congênita, novas investigações serão necessárias para uma melhor compreensão acerca da participação concreta de HO-1 na infecção de células trofoblásticas por *T. gondii*, bem como para uma determinação exata de quais mecanismos intracelulares “*upstream*” e/ou “*downstream*” estão envolvidos com a atuação desta enzima, no contexto investigado.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo é reduzida frente aos tratamentos com hemina, porfirina indutora de HO-1. Além disso, células BeWo tratadas são mais resistentes à redução da viabilidade, em relação às células HTR-8/SVneo também tratadas;
- A susceptibilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii* é aumentada pelo tratamento com hemina, uma vez que os estímulos com a porfirina elevam os índices de proliferação do parasito nestas células trofoblásticas;
- Células BeWo reduzem a expressão de HO-1 frente à infecção por *T. gondii*, e a aumentam sob influência de hemina, ao passo que a expressão da enzima em células HTR-8/SVneo, permanece inalterada;
- A atividade funcional de HO-1 em células BeWo é reduzida frente à infecção por *T. gondii* e inalterada em células HTR-8/SVneo
- Em infecção por *T. gondii*, a expressão de HO-1 em células BeWo está vinculada com a ativação de p38-MAPK, ao passo que em células HTR-8/SVneo, o tratamento com hemina aumenta a fosforilação de JNK;
- Células BeWo e HTR-8/SVneo aumentam as secreções das citocinas IL-6 e IL-8 em infecção por *T. gondii*, associada, ou não, ao estímulo com hemina;
- Células HTR-8/SVneo aumentam a produção de MIF frente à infecção por *T. gondii*, independentemente do tratamento com hemina;
- O mecanismo dependente da produção de óxido nítrico (NO) para o controle da infecção por *T. gondii*, não atua em células BeWo e HTR-8/SVneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M.A.; KILANI, R.T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L.J. Infection of placental trophoblast by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 4, p. 608-616, Ago., 2003.

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A.W.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; RAJAPAKSE, R.; ANTONI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. Role of gamma interferon and T cells in congenital *Toxoplasma* transmission. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 8-9, p. 315-318, Ago.-Set., 2004.

ABOU-KHEIR, W.; BARRAK, J.; HADADEH, O.; DAOUD, G. HTR-8/SVneo cell line contains a mixed population of cells. **Placenta**, v. 50, p. 1-7, Fev., 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.007>

AHMED, A.; RAHMAN, M.; ZHANG, X.; ACEVEDO, C.H.; NIJJAR, S.; RUSHTON, I.; BUSSOLATI, B.; St JOHN, J. Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 5, 391-409, Mai., 2000.

ALIBERTI, J.; HIENY, S.; REIS E SOUSA, C.; SERHAN, C.N.; SHER, A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. **Nature Immunology**, v. 3, n. 1, p. 76-82, Jan., 2002.
<https://doi.org/10.1038/ni745>

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 2, p. 162-170, Fev., 2005.
<https://doi.org/10.1038/nri1547>

ALIJOTAS-REIG, J.; LLURBA, E.; GRIS, J.M. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 241-248, Abr., 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.004>

ANDER, S.E.; RUDZKI, E.N.; ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C.B.; BOYLE, J.P. Human placental syncytiotrophoblasts restrict *Toxoplasma gondii* attachment and replication and respond to infection by producing immunomodulatory chemokines. **MBio**, v. 9, n. 1, p. 1-14, Jan., 2018.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01678-17>

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. 973-982, Nov., 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.09.005>

ANIN, S.A.; VINCE, G.; QUENBY, S. Trophoblast invasion. **Human Fertility (Cambridge, England)**, v. 7, n. 3, p. 169-174, Set., 2004.

APLIN, J.D. The cell biological basis of human implantation. **Bailliere's Best Practice and Research. Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 14, n. 5, p. 757-764, Out., 2000.

APPLETON, S.D.; MARKS, G.S.; NAKATSU, K.; BRIEN, J.F.; SMITH, G.N.; GRAHAM, C.H.; LASH, G.E. Effects of hypoxia on heme oxygenase expression in human chorionic villi explants and immortalized trophoblast cells. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 3, p. 853-858, Mar., 2003.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00655.2002>

APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFETT, A. A critical look at HLA-G. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 7, p. 313-321, Jul., 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.012>

ARAUJO, E.C.B. **Heme oxigenase-1 na infecção por *Toxoplasma gondii*: funções divergentes no controle do parasitismo *in vitro* e *in vivo***. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

ARAUJO, E.C.; BARBOSA, B.F.; COUTINHO, L.B.; BARENCO, P.V.; SOUSA, L.A.; MILANEZI, C.M.; BONFÁ, G.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.S.; FERRO, E.A.; SILVA, D.A.; CUNHA-JUNIOR, J.P.; SILVA, N.M. Heme oxygenase-1 activity is involved in the control of *Toxoplasma gondii* infection in the lung of BALB/c and C57BL/6 and in the small intestine of C57BL/6 mice. **Veterinary Research**, v. 44, n. 89, p. 1-14, Out., 2013.

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

<https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1299>

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

<https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1200>

ARCURI, F.; CINTORINO, M.; CARDUCCI, A.; PAPA, S.; RIPARBELLI, M.G.; MANGIONI, S.; DI BLASIO, A.M.; TOSI, P.; VIGANÒ, P. Human decidual natural killer

cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 131, n. 1, p. 175-182, Jan., 2006.

<https://doi.org/10.1530/rep.1.00857>

ARCURI, F.; BUCHWALDER, L.; TOTI, P.; CINTORINO, M.; TOSI, P.; LOCKWOOD, C.J.; RYBALOV, B.; SCHATZ, F. Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 433-439, Mar., 2007.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054189>

ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; DERMODY, T.S.; COYNE, C.B. Microbial vertical transmission during human pregnancy. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 5, p. 561-567, Mai., 2017.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; JONES, J.L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C.C.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55-62, Jan., 2003.

<https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>

BAHN, R.S.; WORSHAM, A.; SPEEQ, K.V. Jr.; ASCOLI, M.; RABIN, D. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 52, n. 3, p. 447-450, 1981.

<https://doi.org/10.1210/jcem-52-3-447>

BAINBRIDGE, S.A.; SMITH, G.N. HO in pregnancy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 8, p. 979-988, Abr., 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.002>

BARBER, A.; ROBSON, S.C.; MYATT, L.; BULMER, J.N.; LYALL, F. Heme oxygenase expression in human placenta and placental bed: reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 7, p. 1158-1168, Mai., 2001.

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

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x>

BARBOSA, B.F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A.O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E₂ production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-162, Mar., 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>

BARBOSA, B.F.; LOPES-MARIA, J.B.; GOMES, A.O.; ANGELONI, M.B.; CASTRO, A.S.; FRANCO, P.S.; FERMINO, M.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; IETTA, F.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 3, p. 1-13, Mar., 2015.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>

BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.; FERRO, E.A.; IETTA, F.; FARIA, M.R.; LORENZON, A.R.; COSTA, A.F.; MARTUCCI, M. Review: putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. **Placenta**, v. 28, p. 51-56, Fev., 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.015>

BILBAN, M.; HASLINGER, P.; PRAST, J.; KLINGLMÜLLER, F.; WOELFEL, T.; HAIDER, S.; SACHS, A.; OTTERBEIN, L.E.; DESOYE, G.; HIDEN, U.; WAGNER, O.; KNÖFLER, M. Identification of novel trophoblast invasion-related genes: heme oxygenase-1 controls motility via peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 1000-1013, 2009.

<https://doi.org/10.1210/en.2008-0456>

BILBAN, M.; TAUBER, S.; HASLINGER, P.; POLLHEIMER, J.; SALEH, L.; PEHAMBERGER, H.; WAGNER, O.; KNÖFLER, M. Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. **Placenta**, v. 31, n. 11, p. 989-996, Nov., 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.08.011>

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

BLADER, I.J.; COLEMAN, B.I.; CHEN, C.T.; GUBBELS, M.J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annual Review of Microbiology**, v. 15, n. 69, p. 463-485, Out., 2015.

BOOTHROYD, J.C.; HEHL, A.; KNOLL, L.J.; MANGER, I.D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 3-9, Jan., 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00182-3)

BOUT, D.; MORETTO, M.; DIMIER-POISSON, I.; GATEL, D.B. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. **Immunobiology**, v. 201, n. 2, p. 225-228, Dez., 1999.

BOUTON, C.; DEMPLE, B. Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in heman cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct

action of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32688-32693, Out., 2000.

BRASIL, T.R.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; MORROT, A.; VETÖ ARNHOLDT, A.C. Host-*Toxoplasma gondii* coadaptation leads to fine tuning of the immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1080, p. 1-9, Set., 2017.

BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M.P.; YOGAVEL, M.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R.L.; HUSSAIN, T.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; TARDIEUX, I.; SHARMA, A.; BELRHALLI, H.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M.A. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 10, p. 2071-2086, Set., 2013.

BROUARD, S.; OTTERBEIN, L.E.; ANRATHER, J.; TOBIASCH, E.; BACH, F.H.; CHOI, A.M.; SOARES, M.P. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, 1015-1026, Out., 2000.

BULLA, R.; FISCHETTI, F.; BOSSI, F.; TEDESCO, F. Feto-maternal immune interaction at the placental level. **Lupus**, v. 13, n. 9, p. 625-629, Set., 2004.

BURTON, G.J.; FOWDEN, A.L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 370, n. 1663, p. 1-8, Mar., 2015.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, p. 6-8, Out., 2015.

BÜTZOW, R. Luteinizing hormone-releasing factor increases release of human chorionic gonadotrophin in isolated cells columns of normal and malignant trophoblasts. **International Journal of Cancer**, v. 29, n. 3, p. 9-11, 1982.
<https://doi.org/10.1002/ijc.2910290103>

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: A review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, Fev., 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.018>

CASTRO, A.S.; ALVES, C.M.; ANGELONI, M.B.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240-247, Mar., 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.006>

CENCI-GOGA, B.T.; ROSSITTO, P.V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C.M.; CULLOR, J.S. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 7, p. 751-762, Jul., 2011.

<https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0795>

CHALLIS, J.R.; LOCKWOOD, C.J.; MYATT, L.; NORMAN, J.E.; STRAUSS, J.F.^{3rd}; PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, California)**, v. 16, n. 2, p. 206-215, Fev., 2009.

<https://doi.org/10.1177/1933719108329095>

CHAUDHRY, S.A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Canadian Family Physician Médecin de Famille Canadien**, v. 60, n. 4, p. 334-336, Abr., 2014.

CHAUVEAU, C.; RÉMY, S.; ROYER, P.J.; HILL, M.; TANGUY-ROYER, S.; HUBERT, F.X.; TESSON, L.; BRION, R.; BERIOU, G.; GREGOIRE, M.; JOSIEN, R.; CURUTI, M.C.; ANEGON, I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1694-1702, Set., 2005.

CHEN, N.; SHAO, W.; LV, P.; ZHANG, S.; CHEN, Y.; ZHU, L.; LU, Y.; SHEN, Y. Hemin-induced Erk1/2 activation and heme oxygenase-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. **Free Radical Research**, v. 41, n. 9, p. 990-996, Set., 2007.

CHOI, B.M.; PAE, H.O.; JEONG, Y.R.; KIM, Y.M.; CHUNG, H.T. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, n. 4, p. 1066-1071, Fev., 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.106>

CHOI, S.H.; PARK, S.J.; CHA, G.H.; QUAN, J.H.; CHANG, N.S.; AHN, M.H.; SHIN, D.W.; LEE, Y.H. *Toxoplasma gondii* protects against H₂O₂-induced apoptosis in ARPE-19 cells through the transcriptional regulation of apoptotic elements and downregulation of the p38 MAPK pathway. **Acta Ophthalmologica**, v. 89, n. 4, p. 350-356, Jun., 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02113.x>

CHUNG, S.W.; HALL, S.R.; PERRELLA, M.A. Role of haem oxygenase-1 in microbial host defence. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 199-207, Fev., 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01261.x>

CLARK, J.E.; FORESTI, R.; GREEN, C.J.; MOTTERLINI, R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. **The Biochemical Journal**, v. 348, p. 615-619, Jun., 2000.

<https://doi.org/10.1042/bj3480615>

CONVERSO, D.P.; TAILLÉ, C.; CARRERAS, M.C.; JAITOVICH, A.; PODEROSO, J.J.; BOCZKOWSKI, J. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme

content and metabolism. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 8, p. 1236-1238, Jun., 2006.

<https://doi.org/10.1096/fj.05-4204fje>

COSTA, D.L.; NAMASIVAYAM, S.; AMARAL, E.P.; ARORA, K.; CHAO, A.; MITTEREDER, L.R.; MAIGA, M.; BOSHOFF, H.I.; BARRY, C.E.^{3rd}; GOULDING, C.W.; ANDRADE, B.B.; SHER, A. Pharmacological inhibition of host heme oxygenase-1 suppresses *Mycobacterium tuberculosis* infection *in vivo* by a mechanism dependent on T lymphocytes. **MBio**, v. 7, n. 5, p. 1-6, Out., 2016.

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

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.01.006>

CUNNINGTON, A.J.; NJIE, M.; CORREA, S.; TAKEM, E.N.; RILEY, E.M.; WALTHER, M. Prolonged neutrophil dysfunction after *Plasmodium falciparum* malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 189, n. 11, p. 5336-5346, Dez., 2012.

DARD, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M.P.; PELLOUX, H. Relevance of and new developments in serological for toxoplasmosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 492-506, Jun., 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>

DEALTRY, G.B.; O'FARRELL, M.K.; FERNANDEZ, N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, n. 2, p. 107-119, Out., 2000.

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

DENKERS, E.Y.; BUTCHER, B.A.; DEL RIO, L.; KIM, L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 191-205, Out., 2004.

DENNERY, P.A. Signaling function of heme oxygenase proteins. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 11, p. 1743-1753, Abr., 2014.

<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5674>

DIMIER, I.H.; BOUT, D.T. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN- γ -activated human intestinal epithelial cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 75, n. 5, p. 511-514, Out., 1997.

DIMIER, I.H.; BOUT, D.T. Interferon- γ -activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. **Immunology**, v. 94, n. 4, p. 488-495, Ago., 1998.

DONNELLY, L.; CAMPLING, G. Functions of the placenta. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 3, p. 136-139, Mar., 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2014.01.004>

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299., Abr., 1998.

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, Set., 2012.

DUBREMETZ, J.F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 27-30, Jan., 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01165-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01165-7)

DUNAY, I.R.; SIBLEY, D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 462-466, Ago., 2010.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J.C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p. 280-285, Jan., 2009.
<https://doi.org/10.1086/595793>

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 in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190-196, Abr., 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, Fev-Abr., 2002.
<https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0539>

EPIPHANIO, S.; MIKOLAJCZAK, S.A.; GONÇALVES, L.A.; PAMPLONA, A.; PORTUGAL, S.; ALBUQUERQUE, S.; GOLDBERG, M.; REBELO, S.; ANDERSON, D.G.; AKINC, A.; VORNLOCHER, H.P.; KAPPE, S.H.; SOARES, M.P.; MOTA, M.M. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine *Plasmodium* liver infection. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 5, p. 331-338, Mai., 2008.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-148, Mar., 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200003>

FERREIRA, L.M.; MEISSNER, T.B.; TILBURGS, T.; STROMINGER, J.L. HLA-G: At the interface of maternal-fetal tolerance. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 4, p. 272-286, Abr., 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.01.009>

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

FERRO, E.A.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D.A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 50-58, Jan., 2008.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070432>

FIGUEIREDO, A.S.; SCHUMACHER, A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. **Immunology**, v. 148, n. 1, p. 13-21, Mai., 2016.

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

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E.P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A.A.; SHENOY, A.S.; TERRAZAS, L.I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A.R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 10, p. 3661-3671, Out., 2008.

FORESTI, R.; HOQUE, M.; BAINS, S.; GREEN, C.J.; MOTTERLINI, R. Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway. **The Biochemical Journal**, v. 372, p. 381-390, Jun., 2003.
<https://doi.org/10.1042/bj20021516>

FRANCO, P.S.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 838-844, Nov., 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.012>

FRANCO, P.S.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; IETTA, 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. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 181, p. 1-13, Mar., 2015.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00181>

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

<https://doi.org/10.1053/plac.1999.0494>

FUJIWARA, T.; HARIGAE, H. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/278536>

GAZZINELLI, R.T.; MENDONÇA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132-138, Feb., 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>

GODBOLE, G.; SUMAN, P.; GUPTA, S.K.; MODI, D. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, p. 1278-1283, Mar., 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.045>

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. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, Jun., 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>

GRAHAM, C.H.; LALA, P.K. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. **Biochemistry and Cell Biology - Biochimie et Biologie Cellulaire**, v. 70, n. 10-11, p. 867-874, Out-Nov., 1992.

GRAHAM, C.H.; HAWLEY, T.S.; HAWLEY, R.G.; MACDOUGALL, J.R.; KERBEL, R.S.; KHOO, N.; LALA, P.K. Establishment and characterization of first trimester human

trophoblast cells with extended lifespan. **Experimental Cell Research**, v. 206, n. 2, p. 204-211, 1993.

<https://doi.org/10.1006/excr.1993.1139>

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, Oct., 1982.

GRIFFITH, O.W.; WAGNER, G.P. The placenta as a model for understanding the origin and evolution of vertebrate organs. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1-10, Mar., 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0072>

GRIGG, M.E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A.B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J.C. Success and virulence in *Toxoplasma gondii* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5540, p. 161-165, Oct., 2001.

GUBBELS, M.J.; DURAISINGH, M.T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1071-1081, Nov., 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.009>

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

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>

GUIRELLI, P.M.; ANGELONI, M.B.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; FRANCO, P.S.; SILVA, R.J.; OLIVEIRA, J.G.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; FERRO, E.A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 36, n. 10, p. 1106-1114, Oct., 2015.

GUPTA, S.L.; CARLIN, J.M.; PYATI, P.; DAI, W.; PFEFFERKORN, E.R.; MURPHY, M.J.Jr. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2277-2284, Jun., 1994.

GUPTA, S.K.; MALHOTRA, S.S.; MALIK, A.; VERMA, S.; CHAUDHARY, P. Cell signaling pathways involved during invasion and syncytialization of trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 75, n. 3, p. 361-371, Mar., 2016.

HA, J.G.; LI, L.; LEE, D.H.; NA, S.H.; HA, K.S.; KIM, Y.M. KO, J.H.; HWANG, J.Y. The effects of heme oxygenase by-products on the proliferation and invasion of HUVECs, HTR-8/SVneo cells, 3A(tPA 30-1) cells, and HESCs under varying oxygen concentrations. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 12, p. 1530-1538, 2015.

<https://doi.org/10.1177/1933719115589415>

HAKIMI, M.A.; OLIAS, P.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 615-645, Jul., 2017.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00005-17>

HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 125-145, 2013.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>

HAMBARTSOUMIAN, E.; SRIVASTAVA, R.K.; SEIBEL, M.M. Differential expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in human trophoblast *in vitro*. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 45, n. 2, p. 78-85, Fev., 2001.

HAN, M.; JIANG, Y.; LAO, K.; XU, X.; ZHAN, S.; WANG, Y.; HU, X. sHLA-G involved in the apoptosis of decidual natural killer cells following *Toxoplasma gondii* infection. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1718-1727, Out., 2014.

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.; BENHARROCH, D.; PORGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nature Medicine**, v. 12, n. 9, p. 1065-1074, Set., 2006.

HASHINO, M.; TACHIBANA, M.; NISHIDA, T.; HARA, H.; TSUCHIYA, K.; MITSUYAMA, M.; WATANABE, K.; SHIMIZU, T.; WATARAI, M. Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1145, p. 1-13, Out., 2015.

HAYASHI, S.; OMATA, Y.; SAKAMOTO, H.; HIGASHIMOTO, Y.; HARA, T.; SAGARA, Y.; NOGUCHI, M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. **Gene**, v. 336, n. 2, p. 241-250, Jul., 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.002>

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews. Conference of Research Workers in Animal Disease**, v. 6, n. 1, p. 41-61, Jun., 2005.
<https://doi.org/10.1079/AHR2005100>

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, Dez., 1995.

HU, Y.; DUTZ, J.P.; MACCALMAN, C.D.; YONG, P.; TAN, R.; VON DADELSZEN, P. Decidual NK cells alter *in vitro* first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role

for IFN- γ . **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 177, n. 12, p. 8522-8530, Dez., 2006.

HU, S.; WEI, W.; KORNER, H. The role of monocytes in models of infection by protozoan parasites. **Molecular Immunology**, v. 88, p. 174-184, Ago., 2017.

HUALIN, C.; WENLI, X.; DAPENG, L.; XIJING, L.; XIUHUA, P.; QINGFENG, P. The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages. **Inflammation**, v. 35, n. 3, p. 1087-1093, Jun., 2012.
<https://doi.org/10.1007/s10753-011-9415-4>

HULL, T.D.; AGARWAL, A.; GEORGE, J.F. The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 11, p. 1770-1788, Abr., 2014.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5673>

HUNTER, C.A.; SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-778, Nov., 2012.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>

HUPPERTZ, B. Placental pathology in pregnancy complications. **Thrombosis Research**, v. 127, p. 96-99, Fev., 2011.
[https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(11\)70026-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(11)70026-3)

HUPPERTZ, B.; WEISS, G.; MOSER, G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 101-102, p. 74-79, Mar., 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.04.003>

HWANG, I.Y.; QUAN, J.H.; AHN, M.H.; AHMED, H.A.; CHA, G.H.; SHIN, D.W.; LEE, Y.H. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1313-1321, Nov., 2010.
<https://doi.org/10.1007/s00436-010-1999-3>

IMMENSCHUH, S.; RAMADORI, G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, v. 60 n. 8, p. 1121-1128, Out., 2000.

IMMENSCHUH, S.; VIJAYAN, V.; JANCIAUSKIENE, S.; GUELER, F. Heme as a target for therapeutic interventions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 146, p. 1-15, Abr., 2017.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00146>

ISMAIL, H.A.H.A.; KANG, B.H.; KIM, J.S.; LEE, J.H.; CHOI, I.W.; CHA, G.H.; YULK, J.M.; LEE, Y.H. IL-12 e IL-23 production in *Toxoplasma gondii*- or LPS-treated Jurkat T cells via PI3K and MAPK signaling pathways. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, n. 6, p. 613-622, Dez., 2017.

JAMAL UDDIN, M.; JOE, Y.; KIM, S.K.; OH JEONG, S.; RYTER, S.W.; PAE, H.O.; CHUNG, H.T. IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 2, p. 170-179, Mar., 2016.

<https://doi.org/10.1038/cmi.2015.02>

JENEY, V.; RAMOS, S.; BERGMAN, M.L.; BECHMANN, I.; TISCHER, J.; FERREIRA, A.; OLVEIRA-MARQUES, V.; JANSE, C.J.; REBELO, S.; CARDOSO, S.; SOARES, M.P. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. **Cell Reports**, v. 8, n. 1, p. 126-136, Jul., 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.054>

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

JOHN, R.; HEMBERGER, M. A placenta for life. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, n. 1, p. 5-11, Jul., 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.018>

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 6, p. 845-851, Set., 2012.

JOVANOVIĆ, M.; VICOVAC, L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. **Placenta**, v. 30, n. 4, p. 320-328, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.013>

JOVANOVIĆ, M.; STEFANOSKA, I.; RADOJČIĆ, L.; VIĆOVAC, L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins α_5 and β_1 . **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 4, p. 789-798, Abr., 2010.

<https://doi.org/10.1530/REP-09-0341>

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 149, p. 1-38, Abr., 2003.

KAPTURCZAK, M.H.; WASSERFALL, C.; BRUSKO, T.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; ELLIS, T.M.; ATKINSON, M.A.; AGARWAL, A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 3, p. 1045-1053, Set., 2004.

KIM, J.M.; OH, Y.K.; KIM, Y.J.; CHO, S.J.; AHN, M.H.; CHO, Y.J. Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Parasitology Research**, v. 87, n. 9, p. 758-763, Set., 2001.

KIM, L.; BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 5, p. 3003-3010, Mar., 2004.

KIM, H.P.; WANG, X.; GALBIATI, F.; RYTER, S.W.; CHOI, A.M. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 10, p. 1080-1089, Jul., 2004.
<https://doi.org/10.1096/fj.03-1391com>

KIM, L.; DEL RIO, L.; BUTCHER, B.A.; MOGENSEN, T.H.; PALUDAN, S.R.; FLAVELL, R.A.; DENKERS, E.Y. p38 MAPK autophosphorylation drives macrophages IL-12 production during intracellular infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 174, n. 7, p. 4178-4184, Abr., 2005.

KIM, H.P.; RYTER, S.W.; CHOI, A.M. CO as a cellular signaling molecule. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 411-449, Set., 2006.

KIM, J.Y.; AHN, M.H.; SONG, H.O.; CHOI, J.H.; RYU, J.S.; MIN, D.Y.; CHO, M.H. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 197-207, Set., 2006.

KIM, K.; WEISS, L.M. *Toxoplasma*: the next 100 years. **Microbes and Infection. Institut Pasteur**, v. 10, n. 9, p. 978-984, Jul., 2008.

KING, A.; HIBY, S.E.; GARDNER, L.; JOSEPH, S.; BOWEN, J.M.; VERMA, S.; BURROWS, T.D.; LOKE, Y.W. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – A review. **Placenta**, v. 21, p. 81-85, Mar-Abr., 2000.
<https://doi.org/10.1053/plac.1999.0520>

KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2-3, p. 269-280, 2010.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082769mk>

KOGA, K.; ALDO, P.B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulates of immune response. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 35, n. 2, p. 191-202, Abr., 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x>

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 3, p. 212-216, Mar., 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.08.023>

KREISER, D.; KELLY, D.K.; SEIDMAN, D.S.; STEVENSON, D.K.; BAUM, M.; DENNERY, P.A. Gestational pattern of heme oxygenase expression in the rat. **Pediatric Research**, v. 54, n. 2, p. 172-178, Ago., 2003.

KRIVOKUĆA, M.J.; STEFANOSKA, I.; ABU RABI, T.; AL-ABED, Y.; STOŠIĆ-GRUJIĆIĆ, S.; VIĆOVAC, L. Pharmacological inhibition of MIF interferes with trophoblast cells migration and invasiveness. **Placenta**, v. 36, n. 2, p. 150-159, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.003>

KWEIDER, N.; FRAGOULIS, A.; ROSEN, C.; PECKS, U.; RATH, W.; PUFE, T.; WRUCK, C.J. Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): implicatons for preeclampsia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 42863-42872, 2011.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286880>

LALA, P.K.; NANDI, P. Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: The role of decorin. **Cell Adhesion and Migration**, v. 10, n. 1-2, p. 111-125, Mar., 2016.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1106669>

LEE, F.D. The role of interleukin-6 in development. **Developmental Biology**, v. 151, n. 2, p. 331-338, Jun., 1992.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90173-E](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90173-E)

LEE, T.S.; CHAU, L.Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. **Nature Medicine**, v. 8, n. 3, p. 240-246, Mar., 2002.
<https://doi.org/10.1038/nm0302-240>

LEE, T.S.; TSAI, H.L.; CHAU, L.Y. Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19325-19330, Mai., 2003.

LEVYTSKA, K.; KINGDOM, J.; BACZYK, D.; DREWLO, S. Heme oxygenase-1 in placental development and pathology. **Placenta**, v. 34, n. 4, p. 291-298, Abr., 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.01.004>

LI, J.; ZHOU, J.; YE, Y.; LIU, Q.; WANG, X.; ZHANG, N.; WANG, X. Increased heme oxygenase-1 and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 in the placenta have a cooperative action on preeclampsia. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 81, n. 6, p. 543-551, 2016.
<https://doi.org/10.1159/000451025>

LIN, Q.; WEIS, S.; YANG, G.; WENG, Y.H.; HELSTON, R.; RISH, K.; SMITH, A.; BORDNER, J.; POLTE, T.; GAUNITZ, F.; DENNERY, P.A. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20621-20633, Jul., 2007.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M607954200>

LINZKE, N.; SCHUMACHER, A.; WOIDACKI, K.; CROY, B.A.; ZENCLUSSEN, A.C. Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 63, n. 3, p. 580-588, Mar., 2014.

LIU, M.; WILSON, N.O.; HIBBERT, J.M.; STILES, J.K. STAT3 regulates MMP3 in heme-induced endothelial cell apoptosis. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. 1-12, Ago., 2013.

LIU, Y.; ZHANG, L.; GAO, M.; ZHANG, F.; XU, X.; LIU, X.; HU, X. Changes of inhibitory receptors on NK-92 cells and HLA-G on BeWo cells with *Toxoplasma gondii* infection. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1440-1447, Dez., 2013.

LIU, M.; HASSANA, S.; STILES, J.K. Heme-mediated apoptosis and fusion damage in BeWo trophoblast cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 36193, p. 1-12, Out., 2016.

LOCKWOOD, C.J.; YEN, C.F.; BASAR, M.; KAYISLI, U.A.; MARTEL, M.; BUHIMSCHI, I.; BUHIMSCHI, C.; HUANG, S.J.; KRIKUN, G.; SCHATZ, F. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression on human decidual cells. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 6, p. 1571-1579, Jun., 2008.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070629>

LOKE, Y.W. Experimenting with human extravillous trophoblast: a personal view. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 24, n. 1, p. 22-28, 1990.

LOPES, C.S.; 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. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865-1875, Jul., 2016.

<https://doi.org/10.1017/S0950268815003295>

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

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.013>

LUZ, N.F.; ANDRADE, B.B.; FEIJÓ, D.F.; ARAÚJO-SANTOS, T.; CARVALHO, G.Q.; ANDRADE, D.; ABÁNADES, D.R.; MELO, E.V.; SILVA, A.M.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SOARES, R.P.; ALMEIDA, R.P.; BOZZA, M.T.;

BORGES, V.M. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 188, n. 9, p. 4460-4467, Mai., 2012.

LYALL, F.; BARBER, A.; MYATT, L.; BULMER, J.N.; ROBSON, S.C. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placenta function. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 1, p. 208-219, Jan., 2000.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.14.1.208>

LYALL, F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. **The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 46, n. 4, p. 266-273, Ago., 2006.

MA, J.L.; YANG, P.Y.; RUI, Y.C.; LU, L.; KANG, H.; ZHANG, J. Hemin modulates cytokine expressions in macrophage-derived foam cells via heme oxygenase-1 induction. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 103, n. 3, p. 261-266, Mar., 2007.
<https://doi.org/10.1254/jphs.FP0060270>

MACHADO, F.S.; JOHNDROW, J.E.; ESPER, L.; DIAS, A.; BAFICA, A.; SERHAN, C.N.; ALIBERTI, J. Anti-inflammatory actions of lipoxin A₄ and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature Medicine**, v. 12, n. 3, p. 330-334, Mar., 2006.
<https://doi.org/10.1038/nm1355>

MAINES, M.D.; TRAKSHEL, G.M.; KUTTY, R.K. Characterization of two constitutive forms of rat microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 411-419, Jan., 1986.

MAKRIGIANNAKIS, A.; KARAMOUTI, M.; DRAKAKIS, P.; LOUTRADIS, D.; ANTSAKLIS, A. Fetomaternal immunotolerance. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 6, p. 482-496, Dez., 2008.

MALDONADO-ESTRADA, J.; MENU, E.; ROQUES, P.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHAOUAT, G. Evaluation of cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 286, n. 1-2, p. 21-34, Mar., 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.03.001>

MALTEPE, E.; FISHER, S.J. Placenta: the forgotten organ. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 31, p. 523-552, 2015.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125620>

MARGNI, R.A.; ZENCLUSSEN, A.C. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 46, n. 3, p. 181-187, Set., 2001.

MASON, N.J.; FIORE, J.; KOBAYASHI, T.; MASEK, K.S.; CHOI, Y.; HUNTER, C.A. TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5662-5667, Oct., 2004.

MCAULEY, J.B. Congenital toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, p. 30-35, Set., 2014.

MCCONKEY, C.A.; DELORME-AXFORD, E.; NICKERSON, C.A.; KIM, K.S.; SADOVSKY, Y.; BOYLE, J.P.; COYNE, C.B.A three-dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. **Science Advances**, v. 2, n. 3, p. 1-9, Mar., 2016.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1501462>

MCCOUBREY, W.K.Jr.; EWING, J.F.; MAINES, M.D. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 295, n. 1, p. 13-20, Mai., 1992.

MCCOUBREY, W.K.Jr.; HUANG, T.J.; MAINES, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **European Journal of Biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 725-732, Jul., 1997.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x>

MCD AID, J.; YAMASHITA, K.; CHORA, A.; ÖLLINGER, R.; STROM, T.B.; LI, X.C.; BACH, F.H.; SOARES, M.P. Heme oxygenase-1 modulates the allo-immune response by promoting activation-induced cell death of T cells. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 3, p. 1-22, Mar., 2005.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2217fje>

MCFADDEN, G.I. Apicoplast. **Current Biology: CB**, v. 24, n. 7, p. 262-263, Mar., 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.024>

MCFADDEN, G.I.; YEH, E. The apicoplast: now you see it, now you don't. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 137-144, Feb., 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.005>

MCLAUGHLIN, B.E.; LASH, G.E.; SMITH, G.N.; MARKS, G.S.; NAKATSU, K.; GRAHAM, C.H.; BRIEN, J.F. Heme oxygenase expression in selected regions of term human placenta. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 228, n. 5, p. 564-567, Mai., 2003.

MCLEAN, M.; BOWMAN, M.; CLIFTON, V.; SMITH, R.; GROSSMAN, A.B. Expression of the heme oxygenase-carbon monoxide signalling system in human placenta. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 6, p. 2345-2349, Jun., 2000.

<https://doi.org/10.1210/jcem.85.6.6705>

MEDAWAR, P.B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 7, p. 320-328, 1953.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J.G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da gestação. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 50, n. 2, p. 145-151, Abr-Jun., 2006.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; IKIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23-39, Jan., 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>

MOFFETT, A.; CHARAZA, O.; COLUCCI, F. Maternal allo-recognition of the fetus. **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 6, p. 1269-1272, Jun., 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.001>

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

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 63, n. 6, p. 425-433, Jun., 2010.

MOR, G.; CARDENAS, I.; ABRAHAMS, V.; GULLER, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, p. 80-87, Mar., 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x>

MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A.B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nature Reviews: Immunology**, v. 17, n. 8, p. 469-482, Ago., 2017.

MORAES-PINTO, M.I.; VINCE, G.S.; FLANAGAN, B.F.; HART, C.A.; JOHNSON, P.M. Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes. **Immunology**, v. 90, n. 1, p. 87-94, 1997.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00139.x>

MORDUE, D.G.; HÅKANSSON, S.; NIESMAN, I.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuolar that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. **Experimental Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 87-99, Jun., 1999.

<https://doi.org/10.1006/expr.1999.4412>

MORRIS, A.C.; RILEY, J.L.; FLEMING, W.H.; BOSS, J.M. MHC class II gene silencing in trophoblast cells is caused by inhibition of CIITA expression. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 40, n. 6, p. 385-394, Dez., 1998.

MORRISSETTE, N. Targeting *Toxoplasma* tubules: tubulin, microtubules and associated proteins in a human pathogen. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 1, p. 2-12, Jan., 2015.

<https://doi.org/10.1128/EC.00225-14>

MORSE, D.; CHOI, A.M. Heme oxygenase-1: from bench to bedside. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 6, p. 660-670, Set., 2005.

MOSER, G.; GAUSTER, M.; ORENDI, K.; GLASNER, A.; THEUERKAUF, R.; HUPPERTZ, B. Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 25, n. 5, p. 1127-1136, Mai., 2010.

MOSER, G.; HUPPERTZ, B. Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking. **Placenta**, v. 56, p. 19-26, Ago., 2017.

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

MOTTERLINI, R.; FORESTI, R.; VANDEGRIFF, K.; INTAGLIETTA, M.; WINSLOW, R.M. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. **The American Journal of Physiology**, v. 269, p. 648-655, Ago., 1995.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; HIGASHIMURA, Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 564, p. 83-88, Dez., 2014.

NAKASHIMA, A.; ITO, M.; SHIMA, T.; BAC, N.D.; HIDAKA, T.; SAITO, S. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 64, n. 1, p. 4-11, Jul., 2010.

NEWBY, D.; COUSINS, F.; MYATT, L.; LYALL, F. Heme oxygenase expression in cultured human trophoblast cells during *in vitro* differentiation: effects of hypoxia. **Placenta**, v. 26, n. 2-3, p. 201-209, Fev.-Mar., 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.05.002>

NIKOLIC, I.; VUJICIC, M.; STOJANOVIC, I.; STOSIC-GRUJICIC, S.; SAKSIDA, T. Carbon monoxide-releasing molecule-A1 inhibits Th1/Th17 and stimulates Th2 differentiation *in vitro*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 80, n. 2, p. 95-100, Ago., 2014.

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

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.06.006>

ONG, Y.C.; REESE, M.L.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28731-28740, Set., 2010.

ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; CAÑEDO-SOLARES, I.; RICO-TORRES, C.P.; SAHAGÚN-RUIZ, A.; MEDINA-ESCUZIA, M.E.; CORREA, D. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 5, p. 363-373, Jul., 2010.

<https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>

OTTERBEIN, L.E.; SOARES, M.P.; YAMASHITA, K.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, 449-455, Ago., 2003.

OTTERBEIN, L.E.; FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the heart: the balancing act between danger signaling and pro-survival. **Circulation Research**, v. 118, n.12, p. 1940-1959, Jun., 2016.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306588>

OTUN, H.A.; LASH, G.E.; INNES, B.A.; BULMER, J.N.; NARUSE, K.; HANNON, T.; SEARLE, R.F.; ROBSON, S.C. Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 88, n. 1, p. 1-11, Jan., 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.10.003>

OZ, H.S. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 385, p. 1-6, Jul., 2014

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00385>

OZEN, M.; ZHAO, H.; LEWIS, D.B.; WONG, R.J.; STEVENSON, D.K. Heme oxygenase and the immune system in normal and pathological pregnancies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 84, p. 1-13, Abr., 2015.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00084>

PAE, H.O.; SON, Y.; KIM, N.H.; JEONG, H.J.; CHANG, K.G.; CHUNG, H.T. Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 251-257, Dez., 2010.

PAIVA, C.N.; FEIJÓ, D.F.; DUTRA, F.F.; CARNEIRO, V.C.; FREITAS, G.B.; ALVES, L.S.; MESQUITA, J.; FORTES, G.B.; FIGUEIREDO, R.T.; SOUZA, H.S.; FANTAPPIÉ, M.R.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M.T. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2531-2542, Jul., 2012.

<https://doi.org/10.1172/JCI58525>

PAMPLONA, A.; FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V.; BALLA, G.; EPIPHANIO, S.; CHORA, A.; RODRIGUES, C.D.; GREGOIRE, I.P.; CUNHA-RODRIGUES, M.; PORTUGAL, S.; SOARES, M.P.; MOTA, M.M. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental malaria. **Nature Medicine**, v. 13, n. 6, p. 703-710, Jun., 2007.

<https://doi.org/10.1038/nm1586>

PAOLI, M.; MARLES-WRIGHT, J.; SMITH, A. Structure-function relationships in heme-proteins. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 271-280, Abr., 2002.

<https://doi.org/10.1089/104454902753759690>

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

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. 1231-1236, 1968.

PATTILLO, R.A.; HUSSA, R.O.; HUANG, W.Y.; DELFS, E.; MATTINGLY, R.F. Estrogen production by trophoblastic tumors in tissue culture. **The Journal of Clinical Endocrinology**, v. 34, p. 59-61, Jan., 1972.

<https://doi.org/10.1210/jcem-34-1-59>

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

<https://doi.org/10.1210/endo-105-4-967>

PELLOUX, H.; PERNOD, G.; RICARD, J.; RENVERSEZ, T.C.; AMBROISE-THOMAS, P. Interleukin-6 is secreted by human monocytes after stimulation with anti-*Toxoplasma gondii* sera. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 169, n. 5, p. 1181-1182, Mai., 1994.

PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, Abr., 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>

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. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 5, p. 483-489, Out., 2005.

PFAFF, A.W.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 14, p. 1569-1576, Dez., 2005.

PFEFFERKORN, E.R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 81, n. 3, p. 908-912, Fev., 1984.

<https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.908>

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

<https://doi.org/10.1089/jir.1986.6.267>

PHAM, N.K.; MOURIZ, J.; KIMA, P.E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8322-8333, Dez., 2005.

PICCINNI, M.P. T-cell cytokines in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 47, n. 5, p. 289-294, Mai., 2002.

POMARES, C.; MONTOYA, J.G. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2448-2454, Out., 2016

PONKA, P. Cell biology of heme. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, n. 4, p. 241-256, Out., 1999.

QUINTELA-CARVALHO, G.; LUZ, N.F.; CELES, F.S.; ZANETTE, D.L.; ANDRADE, D.; MENEZES, D.; TAVARES, N.M.; BRODSKYN, C.I.; PRATES, D.B.; GONÇALVES, M.S.; DE OLIVEIRA, C.I.; ALMEIDA, R.P.; BOZZA, M.T.; ANDRADE, B.B.; BORGES, V.M. Heme drives oxidative stress-associated cell death in human neutrophils infected with *Leishmania infantum*. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1620, p. 1-12, Nov., 2017.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01620>

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478-482, Oct., 1997.

RAGHUPATHY, R.; MAKHSEED, M.; AZIZIEH, F.; HASSAN, N.; AL-AZEMI, M.; AL-SHAMALI, E. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. **Cellular Immunology**, v. 196, n. 2, p. 122-130, Set., 1999.

REDDI, A.R.; HAMZA, I. Heme mobilization in animals: a metallolipid's journey. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 6, p. 1104-1110, Jun., 2016.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00553>

RICCHETTI, G.A.; WILLIAMS, L.M.; FOXWELL, B.M. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositide-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 3, p. 719-726, Set., 2004.

RIQUELMETE, S.A.; CARREÑO, L.J.; ESPINOZA, J.A.; MACKERN-OBERTI, J.P.; ALVAREZ-LOBOS, M.M.; RIEDEL, C.A.; BUENO, S.M.; KALERGIS, A.M. Modulation of antigen processing by haem-oxygenase-1. Implications of inflammation and tolerance. **Immunology**, v. 149, n. 1, p. 1-12, Set., 2016.

ROBBINS, J.R.; ZELDOVICH, V.B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J.C.; BAKARDJIEV, A.I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 1, p. 418-428, Jan., 2012.
<https://doi.org/10.1128/IAI.05899-11>

ROBBINS, J.R.; BAKARDJIEV, A.I. Pathogens and the placental fortress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 36-43, Feb., 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.006>

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

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, Apr., 2012.
<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 476-488, Jul., 2001.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.476-488.2001>

ROBERTSON, S.A.; MOLDENHAUER, L.M. Immunological determinants of implantation success. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 58, n. 2-4, p. 205-217, 2014.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.140096sr>

ROBINSON, D.P.; KLEIN, S.L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 263-271, Ago., 2012.

ROCKWOOD, N.; COSTA, D.L.; AMARAL, E.P.; DU BRUYN, E.; KUBLER, A.; GIL-SANTANA, L.; FUKUTANI, K.F.; SCANGA, C.A.; FLYNN, J.L.; JACKSON, S.H.; WILKINSON, K.A.; BISHAI, W.R.; SHER, A.; WILKINSON, R.J.; ANDRADE, B.B. *Mycobacterium tuberculosis* induction of heme oxygenase-1 expression is dependent on oxidative stress and reflects treatment outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 542, p. 1-15, Mai., 2017.

ROUAS-FREISS, N.; GONÇALVES, R.M.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 94, n. 21, p. 11520-11525, Out., 1997.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11520>

RYTER, S.W.; ALAM, J.; CHOI, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 583-650, Abr., 2006.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2005>

RYTER, S.W.; CHOI, A.M. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 167, n. 1, p. 7-34, Jan., 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.011>

RYU, B.J.; HAN, J.W.; KIM, R.H.; YUN, S.; KIM, T.H.; HUR, S.E.; KIM, C.J.; LEE, S.K. Activation of NOD-1/JNK/IL-8 signal axis in decidual stromal cells facilitates trophoblast invasion. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 78, n. 2, p. 1-7, Ago., 2017.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 805-814, Nov., 2012.

<https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>

SAEIJ, J.P.; COLLIER, 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. 324-327, Jan., 2007.

<https://doi.org/10.1038/nature05395>

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 2, p. 87-103, Jul., 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(00\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(00)00060-7)

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

<https://doi.org/10.4161/viru.22833>

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**, p. 1-7, Fev., 2018.

<https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>

SCHARTON-KERSTEN, T.M.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1261-1273, Abr., 1997.

<https://doi.org/10.1084/jem.185.7.1261>

SCHLÜTER, D.; DÄUBENER, W.; SCHARES, G.; GROB, U.; PLEYER, U.; LÜDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 304, n. 7, p. 917-929, Oct., 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>

SCHUMACHER, A.; WAFULA, P.O.; TELES, A.; EL-MOUSLEH, T.; LINZKE, N.; ZENCLUSSEN, M.L.; LANGWISCH, S.; HEINZE, K.; WOLLENBERG, I.; CASALIS, P.A.; VOLK, H.D.; FEST, S.; ZENCLUSSEN, A.C. Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. 1-13, Ago., 2012.

SCHUMACHER, A.; COSTA, S.D.; ZENCLUSSEN, A.C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 196, p. 1-12, Mai., 2014.

SCHUMACHER, A.; ZENCLUSSEN, A.C. Effects of heme oxygenase-1 on innate and adaptive immune responses promoting pregnancy success and allograft tolerance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 288, p. 1-9, Jan., 2015.

SEEBER, F.; BOOTHROYD, J.C. Escherichia coli beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Gene**, v. 169, n. 1, p. 39-45, Fev., 1996.

[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00786-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00786-5)

SEIXAS, E.; GOZZELINO, R.; CHORA, A.; FERREIRA, A.; SILVA, G.; LARSEN, R.; REBELO, S.; PENIDO, C.; SMITH, N.R.; COUTINHO, A.; SOARES, M.P. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 106, n. 37, p. 15837-15842, Set., 2009.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0903419106>

SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C.; GÓMEZ-MARIN, J.E.; BOBIĆ, B.; NARANJO-GALVIS, C.A.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, p. 592-601, Nov-Dez., 2014.

SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual control of trophoblast invasion. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 75, n. 3, p. 341-350, Mar., 2016.

SHER, A.; TOSH, K.; JANKOVIC, D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36-42, Jan., 2017.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2016.12>

SIERRA-FILARDI, E.; VEGA, M.A.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; CORBÍ, A.L.; PUIG-KRÖGER, A. Heme oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. **Immunobiology**, v. 215, n. 9-10, p. 788-795, Set.-Out., 2010.

SILVA, N.M.; RODRIGUES, C.V.; SANTORO, M.M.; REIS, L.F.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GAZZINELLI, R.T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 859-868, Fev., 2002.
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.859-868.2002>

SILVA, M.L.; MARTINS, M.A.; ESPÍRITO-SANTO, L.R.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; SILVEIRA-LEMOES, D.; RIBEIRO, J.G.; HOMMA, A.; KROON, E.G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 583-592, Jan., 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.046>

SILVA, J.F.; SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. **Cell Adhesion and Migration**, v. 10, n. 1-2, p. 88-110, Mar., 2016.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1120397>

SILVA, R.J.; GOMES, A.O.; FRANCO, P.S.; PEREIRA, A.S.; MILIAN, I.C.B.; RIBEIRO, M.; FIORENZANI, P.; SANTOS, M.C.; MINEO, J.R.; SILVA, N.M.; FERRO, E.A.V.; BARBOSA, B.F. Enrofloxacin and toltrazuril are able to reduce *Toxoplasma gondii* growth in human BeWo trophoblastic cells and villous explants from human third trimester pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 340, p. 1-21, Jul., 2017.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00340>

SOARES, M.P.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 2, p. 50-58, Fev., 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.12.004>

SOLDATI, D.; MEISSNER, M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 32-40, Fev., 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.013>

SOLLWEDEL, A.; BERTOJA, A.Z.; ZENCLUSSEN, M.L.; GERLOF, K.; LISEWSKI, U.; WAFULA, P.; SAWITZKI, B.; WOICIECHOWSKY, C.; VOLK, H.D.; ZENCLUSSEN, A.C. Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 175, n. 8, p. 4875-4885, Out., 2005.

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

STEINBERG, M.L.; ROBINS, J.C. Cellular models of trophoblast differentiation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 34, n. 1, p. 50-56, Jan., 2016.

<https://doi.org/10.1055/s-0035-1570026>

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

SUKHUMAVASI, W.; EGAN, C.E.; DENKERS, E.Y. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 6, p. 3570-3577, Set., 2007.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137-142, Mar., 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.01.007>

SULLIVAN Jr., W.J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 717-733, Mai., 2012.

SWIERZY, I. J.; MUHAMMAD, M.; KROLL, J.; ABELMANN, A.; TENTER, A.M.; LÜDER, C.G.K. *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 91-98, Feb., 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.10.001>

SZEKERES-BARTHO, J. Immunological relationship between the mother and the fetus. **International Reviews of Immunology**, v. 21, n. 6, p. 471-495, Nov.-Dez., 2002.

SZKLANNA, P.B.; WYNNE, K.; NOLAN, M.; EGAN, K.; ÁINLE, F.N.; MAQUIRE, P.B. Comparative proteomic analysis of trophoblast cell models reveals their differential phenotypes, potential uses and limitations. **Proteomics**, v. 17, n. 10, p. 1-6, Mar., 2017.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201700037>

TACHIBANA, M.; WATANABE, K.; YAMASAKI, Y.; SUZUKI, H.; WATARAI, M. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, n. 2, p. 105-109, Ago., 2008.

TACHIBANA, M.; HASHINO, M.; NISHIDA, T.; SHIMIZU, T.; WATARAI, M. Protective role of heme oxygenase-1 in *Listeria monocytogenes*-induced abortion. *PloS One*, v. 6, n. 9, p. 1-7, Set., 2011.

TAMION, F.; RICHARD, V.; LYOUMI, S.; HIRON, M.; BONMARCHAND, G.; LEROY, J.; DAVEAU, M.; THUILLEZ, C.; LEBRETON, J.P. Induction of haem oxygenase contributes to the synthesis of pro-inflammatory cytokines in re-oxygenated rat macrophages: role of cGMP. **Cytokine**, v. 11, n. 5, p. 326-333, Mai., 1999.

TANAKA, A.; LINDOR, K.; ANSARI, A.; GERSHWIN, M.E. Fetal microchimerisms in the mother: immunologic implications. **Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society**, v. 6, n. 2, p. 138-143, Mar., 2000.
<https://doi.org/10.1002/lt.500060225>

TARDIEUX, I.; BAUM, J. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. **The Journal of Cell Biology**, v. 214, n. 5, p. 507-515, Ago., 2016.

TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 61, n. 2, p. 748-755, Out., 1968.
<https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.748>

TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 23, p. 6388-6394, Dez., 1969.

TEO, C.F.; ZHOU, X.W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V.B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n.2, p. 679-688, Fev., 2007.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01059-06>

TERRAZAS, C.A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L.I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E.A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 348-358, Nov., 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.009>

TURCANU, V.; DHOUIB, M.; POINDRON, P. Determination of heme oxygenase activity in murine macrophages for studying oxidative stress inhibitors. **Analytical Biochemistry**, v. 263, n. 2, p. 251-253, Oct., 1998.

VALÈRE, A.; GARNOTEL, R.; VILLENA, I.; GUENOUNOU, M.; PINON, J.M.; AUBERT, D. Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. **Parasite (Paris, France)**, v. 10, n. 1, p. 59-64, Mar., 2003.

<https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p59>

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

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.024>

VASCONCELLOS, L.R.; DUTRA, F.F.; SIQUEIRA, M.S.; PAULA-NETO, H.A.; DAHAN, J.; KIARELY, E.; CARNEIRO, L.A.; BOZZA, M.T.; TRAVASSOS, L.H. Protein aggregation as a cellular response to oxidative stress induced by heme and iron. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 113, n. 47, p. 7474- 7482, Nov., 2016.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1608928113>

VELICKY, P.; KNÖFLER, M.; POLLHEIMER, J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. **Cell Adhesion and Migration**, v. 10, n. 1-2, p. 154-162, Mar., 2016.

<https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1089376>

WANG, Z.; SUN, D.; CHEN, G.; LI, G.; DOU, S.; WANG, R.; XIAO, H.; HOU, C.; LI, Y.; FENG, J.; SHEN, B.; HAN, G. Tim-3 inhibits macrophage control of *Listeria monocytogenes* by inhibiting Nrf2. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42095, p. 1-14, Feb., 2017.

<https://doi.org/10.1038/srep42095>

WATANABE, S.; AKAGI, R.; MORI, M.; TSUCHIYA, T.; SASSA, S. Marked developmental changes in heme oxygenase-1 (HO-1) expression in the mouse placenta: correlation between HO-1 expression and placental development. **Placenta**, v. 25, n. 5, p. 387-395, May, 2004.

WEGIEL, B.; HAUSER, C.J.; OTTERBEIN, L.E. Heme as a danger molecule in pathogen recognition. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 89, p. 651-661, Dec., 2015.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, Jul., 1993.

[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90235-D](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D)

WEI, S.; MARCHES, F.; DANIEL, B.; SONDA, S.; HEIDENREICH, K.; CURIEL, T. Pyridinylimidazole p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors block intracellular *Toxoplasma gondii* replication. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 969-977, Jul., 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00061-9)

WEIS, N.; WEIGERT, A.; VON KNETHEN, A.; BRÜNE, B. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 5, p. 1280-1288, Mar., 2009.

<https://doi.org/10.1091/mbc.E08-10-1005>

WHITMARSH, R.J.; GRAY, C.M.; GREGG, B.; CHRISTIAN, D.A.; MAY, M.J.; MURRAY, P.J.; HUNTER, C.A. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 3, p. 224-236, Set., 2011.

WILKS, A.; BLACK, S.M.; MILLER, W.L.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Expression and characterization of truncated human heme oxygenase (hHO-1) and a fusion protein of hHO-1 with human cytochrome P450 reductase. **Biochemistry**, v. 34, n. 13, p. 4421-4427, Abr., 1995.

<https://doi.org/10.1021/bi00013a034>

WOUDWYK, M.A.; MONTEAVARO, C.E.; JENSEN, F.; SOTO, P.; BARBEITO, C.G.; ZENCLUSSEN, A.C. Study of the murine local immune response in a murine model of embryonic death due to *Tritrichomonas foetus*. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 68, n. 2, p. 128-137, Ago., 2012.

WU, H.X.; JIN, L.P.; XU, B.; LIANG, S.S.; LI, D.J. Decidual stromal cells recruit Th17 cells into decidua to promote proliferation and invasion of human trophoblast cells by secreting IL-17. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 11, n. 3, p. 253-262, Mai., 2014.

XIA, Z.W.; ZHONG, W.W.; MEYROWITZ, J.S.; ZHANG, Z.L. The role of heme oxygenase-1 in T cell-mediated immunity: the all encompassing enzyme. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 5, p. 454-464, 2008.

<https://doi.org/10.2174/138161208783597326>

YAMAMOTO, M.; STANDLEY, D.M.; TAKASHIMA, S.; SAIGA, H.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; KUBO, E.; ITO, H.; TAKANURA, 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. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 12, p. 2747-2760, Nov., 2009.

<https://doi.org/10.1084/jem.20091703>

YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology**, v. 201, n. 2, p. 240-247, Dez., 1999.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews: Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109-121, Feb., 2014.
<https://doi.org/10.1038/nri3598>

YIN, H.; LI, X.; GONG, Q.; JIN, X.; GU, H.; YUAN, B.; ZHANG, B.; ZHENG, F.; GONG, F.; ZHU, J. Heme oxygenase-1 upregulation improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury involving suppression of macrophage migration inhibitory factor. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 15, p. 2443-2449, Set., 2010.

YOSHIKI, N.; KUBOTA, T.; ASO, T. Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 3, p. 1136-1142, Out., 2000.

ZENCLUSSEN, A.C.; SCHUMACHER, A.; ZENCLUSSEN, M.L.; WAFULA, P.; VOLK, H.D. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1-14, Abr., 2007.
<https://doi.org/10.1017/S1462399407000294>

ZENCLUSSEN, M.L.; LINZKE, N.; SCHUMACHER, A.; FEST, S.; MEYER, N.; CASALIS, P.A.; ZENCLUSSEN, A.C. Heme oxygenase-1 is critically involved in placentation, spiral artery remodeling, and blood pressure regulation during murine pregnancy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 291, p. 1-10, Jan., 2015.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00291>

ZHAO, H.; OZEN, M.; WONG, R.J.; STEVENSON, D.K. Heme oxygenase-1 in pregnancy and cancer: similarities in cellular invasion, cytoprotection, angiogenesis, and immunomodulation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 295, p. 1-10, Jan., 2015.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00295>

ZHAO, H.; KALISH, F.; WONG, R.J.; STEVENSON, D.K. Infiltration of myeloid cells in the pregnant uterus is affected by heme oxygenase-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 217-226, Jan., 2017.
<https://doi.org/10.1189/jlb.1A0116-020RR>

ZIMMERMANN, S.; MURRAY, P.J.; HEEG, K.; DALPKE, A.H. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN- γ signaling. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 176, n. 3, p. 1840-1847, Feb., 2006.

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 ; 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