

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Participação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK)-1/2 e IL-6 na
susceptibilidade de diferentes populações de células trofoblásticas humanas à
infecção por *Toxoplasma gondii***

Fernanda Chaves de Oliveira Victor

Uberlândia

Abril-2018

Fernanda Chaves de Oliveira Victor

**Participação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK)-1/2 e IL-6 na
susceptibilidade de diferentes populações de células trofoblásticas humanas à
infecção por *Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloisa
Amália Vieira Ferro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Bellisa
de Freitas Barbosa

Uberlândia

2018

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

V642p
2018

Victor, Fernanda Chaves de Oliveira, 1987

Participação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK)-1/2 e IL-6 na susceptibilidade de diferentes populações de células trofoblásticas humanas à infecção por *Toxoplasma gondii* / Fernanda Chaves de Oliveira Victor. - 2018.

77 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Coorientadora: Bellisa de Freitas Barbosa.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.470>

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Trofoblastos - Teses. 4. Gravidez – Complicações - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Barbosa, Bellisa de Freitas. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Fernanda Chaves de Oliveira Victor

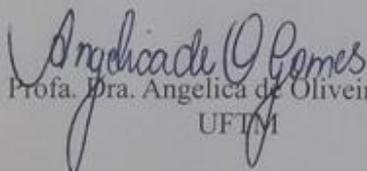
“Participação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) - 1/2 e IL-6 na susceptibilidade de diferentes populações de células trofoblásticas humanas à infecção por *Toxoplasma gondii*”

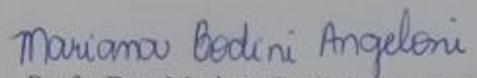
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

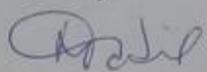
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

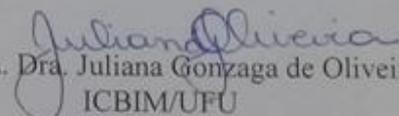
Banca Examinadora:

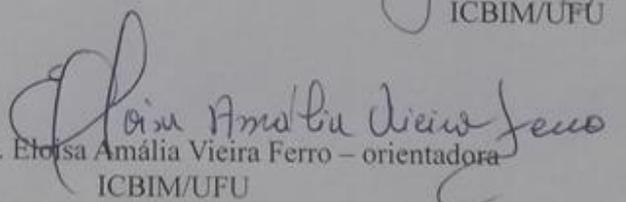
Uberlândia, 5 de abril de 2018.


Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM


Prof. Dra. Mariana Bodini Angeloni
PITÁGORAS


Prof. Dra. Neide Maria da Silva
ICBIM/UFU


Prof. Dra. Juliana Gonzaga de Oliveira
ICBIM/UFU


Prof. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro – orientadora
ICBIM/UFU

SEM SONHOS, A VIDA NÃO TEM BRILHO.

SEM METAS, OS SONHOS NÃO TÊM ALICERCES.

SEM PRIORIDADES, OS SONHOS NÃO SE TORNAM REAIS.

SONHE, TRACE METAS, ESTABELEÇA PRIORIDADES E CORRA RISCOS

PARA EXECUTAR SEUS SONHOS.

MELHOR É ERRAR POR TENTAR DO QUE ERRAR POR SE OMITIR!

AUGUSTO CURY

Dedicatória

Mais um sonho realizado, uma etapa concluída, e junto com ela os agradecimentos a todos as pessoas que me ajudaram a torna - lá realidade. Toda conquista demanda de empenho, força de vontade, abdicação, escolhas, apoio e principalmente de pessoas de luz para caminhar ao seu lado. Tenho certeza que não cheguei aqui sozinha e sim muito bem acompanhada.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, nosso amigo, protetor, amparo nos momentos de dificuldades e alegrias, sem Ele nada é possível de ser alcançado.

Agradeço à minha família, meu ponto de equilíbrio, de amor, afeto, sorrisos e tolerância.

Tudo que sou é devido ao apoio e presença deles, o amor incondicional de vocês me fizeram chegar aqui. Ao meu esposo Neto, por sonhar comigo, apoiar minhas decisões e caminhar essa caminhada ao meu lado nos últimos 10 anos. Obrigada por ser quem você é. Aos meus filhos João Gabriel e Maria Eduarda, esses são a minha força, a eles dedico minha vida, amor mais puro e incondicional que já conheci. A minha mãe Elizabeth e minha irmã Lorena por caminharem sempre ao meu lado, me apoiando, e dedicando um pouco de suas vidas para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa.

A vocês a minha gratidão.

Agradecimentos Especiais

“A persistência é o caminho do êxito” Charles Chaplin

Agradecimento às pessoas que fizeram com que esse trabalho se tornasse realidade. Tenham certeza que sem vocês não teria conseguido terminar mais essa etapa. Obrigada por cada ombro amigo, colaboração, carinho e pelo tempo que dedicaram a estarem do meu lado.

Em especial à minha orientadora **Prof. Dr^a Eloisa Amália Vieira Ferro**. Obrigada por me aceitar e me incluir no seu grupo de pesquisa, obrigada pela oportunidade de aprender e crescer tanto ao seu lado. Sua dedicação ao ensino e à pesquisa nos faz ter orgulho de participar da sua equipe. Hoje me sinto uma pessoa mais forte e segura para enfrentar tudo o que a vida me apresentar. Sou grata a todos os momentos que vivenciamos nesses últimos anos.

À minha co-orientadora **Prof. Dr^a Bellisa de Freitas Barbosa**. Obrigada primeiramente pela sua amizade e por estar sempre de portas abertas para me receber, auxiliar, descomplicar todas as minhas dúvidas. Sempre paciente, dedicada, disposta a ajudar quem precisa. Obrigada por todas as correções, sugestões, e principalmente o tempo que você dedicou a mim e ao meu trabalho.

Às **Profs. Dr^{as} Neide Maria Silva, Juliana Gonzaga de Oliveira e Priscila Silva Franco** por disponibilizarem de seu tempo para participar da minha banca de qualificação. Todas as sugestões foram avaliadas e acrescentaram muito ao nosso trabalho.

Às **Profs. Dr^{as} Neide Maria Silva, Juliana Gonzaga de Oliveira**, por aceitarem mais uma vez participar da banca de defesa e por receberem meu convite com carinho, às **Profs. Dr^{as} Mariana Bodini Angeloni, Angélica de Oliveira Gomes** pela amizade durante essa

caminhada e por aceitarem com tanto carinho participar desse momento. Obrigada a vocês por abrirem espaço nas suas agendas e compartilhar o conhecimento de vocês comigo.

As minhas companheiras e amigas de laboratório **Andressinha, May, Pâmela, Rafa, Iliana, Pri**. Vocês são anjo que Deus colocou em minha vida e que eu quero sempre do meu lado. Receberam-me de coração aberto no laboratório, e agora somos amigas de uma vida, são partes da família que eu escolhi para estar sempre ao meu lado. Obrigada por colaborarem tanto com meu trabalho, sem vocês não teria conseguido. Obrigada por ouvirem e compreenderem minhas angústias. Obrigada por estarem presentes nos momentos de maiores alegrias que tive durante essa etapa. Vou sentir saudades de tudo que vivemos a cada dia no laboratório e de todo amor que recebi de vocês.

Agradeço aos demais colegas do laboratório de Imunofisiologia da Reprodução que de uma forma ou outra estão presentes na execução deste trabalho.

À coordenação do curso por estar sempre presente, trabalhando para que o nosso programa se torne cada vez melhor.

Às secretárias da pós graduação **Lucileide e Lucélia** que sempre atenderam minhas solicitações com muita atenção e carinho.

Aos familiares e amigos, que estando aqui perto ou os mais distantes, sempre torceram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Obrigada a todos vocês que cruzaram meu caminho de maneira tão especial e inesquecível. Saibam que vocês estarão sempre guardados no meu coração. Cada pessoa que passa em nossa vida deixa um pouco de si e nos faz pessoas cada vez melhor, tenho certeza que sou uma nova Fernanda.

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Toxoplasma gondii.....	13
1.1.1	<i>Formas infectantes</i>	14
1.1.2	Cepas de <i>T.gondii</i>	17
1.2	Toxoplasmose Congênita.....	18
1.3	Resposta imune a <i>T. gondii</i>	19
1.4	Resposta imune na gestação.....	24
1.5	Vias de sinalização dependente de ERK1/2.....	26
1.6	Células Trofoblásticas.....	28
1.7	Sinciciotrofoblasto.....	33
1.8	Linhagens Celulares.....	34
2.	JUSTIFICATIVA.....	36
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Cultura de células HTR-8/SVneo e BeWo Cultura de células HTR-8/SVneo e BeWo.....	38
4.2	Manutenção <i>in vitro</i> da cepa RH de <i>T. gondii</i>	39
4.3	Diferenciação de células BeWo em sinciciotrofoblasto....	39
4.4	Ensaio de proliferação de <i>T. gondii</i> em células BeWo (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto) e HTR-8 SV/NEO....	40
4.5	Dosagem de citocinas em sobrenadante de células BeWo (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo, infectadas ou não por <i>T. gondii</i>	41
4.6	Análise da expressão das proteínas intracelulares MAPKs por <i>Western blotting</i> em células BeWo (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo infectadas ou não por <i>T. gondii</i>	42
4.7	Ensaio de proliferação de <i>T. gondii</i> em células BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo após a inibição da via de sinalização de ERK1/2.....	43
4.8	Análise Estatística.....	44
5.	RESULTADOS.....	45
5.1	Diferenciação das células BeWo em sinciciotrofoblasto.....	45
5.2	Células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram maior susceptibilidade à infecção por <i>T. gondii</i>	45

5.3	Células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram menor produção de IL-6.....	46
5.4	As células HTR-8 / SVneo (trofoblasto extraviloso) ativaram maior fosforilação de ERK1/2, especialmente quando infectadas por <i>T. gondii</i>	47
5.5	A inibição de ERK1/2 induz a redução da infecção por <i>T. gondii</i> nas três populações trofoblásticas.....	48
6.	DISCUSSÃO.....	49
7.	CONCLUSÕES.....	55
8.	FIGURAS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	64

RESUMO

Na placentação inicial, as células de citotrofoblasto proliferam e diferencia-se por fusão celular para formar uma camada multinucleada, o sinciciotrofoblasto e também formam o trofoblasto extraviloso que invade a mucosa uterina, fenômeno essencial para uma gestação de sucesso. No curso da gestação, a infecção causada por *Toxoplasma gondii* pode desencadear manifestações graves e potencialmente afetar o desenvolvimento fetal.. Diferenças na susceptibilidade de células trofoblásticas à infecção por *T. gondii* devem ser avaliadas para subsidiar o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas capazes de interferir no controle da infecção fetal sem comprometer o sucesso da gestação. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade de citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e células de trofoblasto extraviloso à infecção por *T. gondii* e possíveis mecanismos celulares envolvidos neste fenômeno. As células BeWo foram utilizadas como modelo de células de citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto (após processo de sincicialização usando Forskolin e PMA), enquanto as células HTR-8/SVneo serviram como modelo de células de trofoblasto extraviloso. As células foram cultivadas sobre lamínulas redondas em placas de 6 poços e infectadas por taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) por 24 horas adicionais. Em paralelo, os três tipos de células foram tratados com inibidor de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK)1/2 (PD98059) durante 3 horas e infectados por *T. gondii* por adicionais 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados para avaliar o perfil das citocinas e as células para analisar quanto ao índice de infecção, número total de parasitos e fosforilação de quinases reguladas por sinais extracelulares (MAPKs). Como resultado, as células HTR-8/SVneo apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *T. gondii* quando comparadas às células de sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto, enquanto que o sinciciotrofoblasto foi o tipo de célula mais resistente à infecção parasitária. Além disso, células de citotrofoblasto e

sinciciotrofoblasto produziram significativamente mais IL-6 do que as células HTR-8/SVneo. Por outro lado, as células HTR-8/SVneo apresentaram maior fosforilação de ERK1/2 do que as demais células trofoblásticas. A inibição de ERK1/2 reduziu a infecção por *T. gondii* e aumentou a produção de IL-6 em células HTR-8/SVneo. Assim, é possível sugerir que as células HTR-8/SVneo foram mais suscetíveis à infecção por *T. gondii* provavelmente porque essas células apresentaram maior fosforilação ERK1/2 e menores níveis de IL-6 em comparação com outras células trofoblásticas, sugerindo que esses mediadores podem ser importantes para favorecer a infecção parasitária neste tipo de população celular placentária.

Palavras Chaves: HTR8/SVNeo. Sinciciotrofoblasto. Citotrofoblasto. ERK1/2. *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

During initial placentation, cytotrophoblast cells proliferate and differentiate by cellular fusion to form a multinucleated layer, the syncytiotrophoblast, and also form the extravillous trophoblast that invades the uterine mucosa, an essential phenomenon for successful gestation. In the course of gestation, infection caused by *Toxoplasma gondii* can trigger serious manifestations and potentially affect fetal development. . Differences in the susceptibility of trophoblastic cells to *T. gondii* infection should be evaluated to support the establishment of new therapeutic approaches capable of interfering in the control of fetal infection without compromising the success of pregnancy. This study aimed to evaluate the susceptibility of cytotrophoblast, syncytiotrophoblast and extravillous trophoblast cells to *T. gondii* infection and possible mechanisms involved in this process. BeWo line cells were used as model of cytotrophoblast (before syncytialization process) and syncytiotrophoblast cells (after syncytialization process by using forskolin and PMA), whereas human HTR-8/SVneo cells served as model of extravillous trophoblast cells, according to previous studies. Cells were cultured in coverslips into 6-well plates and infected by *T. gondii* tachyzoites (RH strain) for additional 24 hours. In parallel, the three cell types were treated with extracellular signals regulated kinases (ERK) 1/2 inhibitor (PD98059) for 3 hours and infected by *T. gondii* for additional 24 hours. The supernatants were collected to measure cytokine profile, and the cells analyzed for infection index, total number of parasites and mitogen activated protein kinases (MAPKs) phosphorylation. HTR-8/SVneo cells showed the highest susceptibility to *T. gondii* infection when compared to syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells, whereas syncytiotrophoblast was the cell type more resistant to the parasite infection. In addition, cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells produced significantly more IL-6 than HTR-8/SVneo cells. On

the other hand, HTR-8/SVneo cells showed higher ERK1/2 phosphorylation than cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells. ERK1/2 inhibition reduced *T. gondii* infection and increased IL-6 production in HTR-8/SVneo cells. Thus, it is possible to suggest that HTR-8/SVneo cells are more susceptible to *T. gondii* infection likely because these cells presented higher ERK1/2 phosphorylation and lower IL-6 levels compared to other cells, suggesting that these mediators can be important to favor the parasite infection in this type of trophoblastic population.

Keywords: HTR-8/SVneo cells. Syncytiotrophoblast. Cytotrophoblast. ERK1/2.

Toxoplasma gondii

INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*: características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito do Filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e Família Sarcocystidae (REY, 2001; BLADER et al., 2015). Apresenta-se como um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de animais de sangue quente, incluindo os seres humanos e alguns invertebrados. Os parasitos podem ser encontrados em vários tecidos, células nucleadas e líquidos orgânicos como saliva, leite, esperma e líquido peritoneal (NEVES, 2003; BLADER; SAEIJ, 2009; SHER, 2016).

Morfologicamente, *T. gondii* apresenta uma estrutura arqueada, núcleo situado na região central do parasito, membrana interna dupla e externa simples, além de organelas típicas de eucariotos. Na região anterior do parasito localiza-se o complexo apical constituído por organelas características do filo Apicomplexa, como conóide, anel polar, microtúbulos subpeculiares, roptrias, micronemas e grânulos densos (NEVES, 2003; BLADER; SAEIJ, 2009). Algumas dessas estruturas são essenciais no processo de adesão e invasão por *T. gondii* na célula do hospedeiro. As micronemas são responsáveis pela secreção de moléculas adesivas, chamadas de proteínas micronemais transmembranas, que agem no reconhecimento e na adesão do parasito aos receptores de superfície da célula hospedeira (BLADER; SAEIJ, 2009; PENG et al., 2011; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016; BASTOS et al., 2016).

Após a adesão de *T. gondii* nas células do hospedeiro, inicia o processo de penetração ativa na célula, que depende da presença de miosina e actina do parasito e dos microtúbulos da célula do hospedeiro, esse processo é rápido, finalizando-se em

cerca de 15 a 75 segundos. Podem ser vistos movimentos de flexão, rotação, deslizamento, sempre tendo o conóide aderido a membrana da célula hospedeira (MATUSCHEWSKI; SCHÜLER, 2008). Na etapa subsequente, ocorre a liberação de proteínas das roptrias que atuam alterando a membrana plasmática da célula hospedeira, tornando-a mais fluída, facilitando a internalização do parasito (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY, 2004; GUBBELS; DURAISINGH, 2012).

Os grânulos densos estão associados à manutenção e crescimento do parasito dentro do vacúolo parasitóforo, o qual é formado pela membrana plasmática da célula do hospedeiro após a invasão do parasito (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Esses grânulos secretam glicoproteínas (GRA-1 a GRA-10) que são liberadas no vacúolo parasitóforo durante e após a invasão da célula hospedeira. São responsáveis por garantir uma fonte de nutrição ao parasito, além de impedirem a ligação dos lisossomos ao vacúolo, auxiliando na evasão do parasito à resposta imune proveniente do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

1.1.1 Formas infectantes

O parasito possui três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas são encontrados dentro de vacúolos parasitóforos de diversas células, como células do sistema mononuclear fagocitário, células hepáticas, musculares, submucosas e células nervosas, além de líquidos orgânicos (NEVES, 2003; TENTER, 2009; YAN, 2016). Estão presentes na forma aguda da infecção e podem se distribuir por todos os órgãos, inclusive na placenta, podendo infectar o feto ou embrião pela via transplacentária. Os taquizoítas foram a primeira forma descrita do parasito e o seu aspecto morfológico, em forma de arco, deu nome ao gênero. Apresenta-se com a forma grosseira de banana ou meia-lua, com uma das extremidades mais afiladas e a outra

arredondada (NEVES, 2003; TENTER, 2009; ALVES et al., 2009; SHER, 2016). São formas pouco resistentes à ação do suco gástrico, no qual são destruídos em pouco tempo, e dependendo da imunidade do hospedeiro, transformam-se em bradizoítas localizados em cistos teciduais (NEVES, 2003; SKARIAH et al., 2010; YAN, 2016).

Os bradizoítas (*brady* = lento), segunda forma infectante, são morfológicamente parecidos com os taquizoítas, porém os bradizoítas se multiplicam lentamente dentro do cisto tecidual, cuja parede é resistente e elástica, sendo capaz de isolar os bradizoítas da ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro (REY, 2001; ALVES et al., 2009; PRADO et al., 2011; YAN, 2016). Eles estão presentes, em maior frequência, nos tecidos musculares esqueléticos, nervosos e cardíacos, são formas que podem permanecer viáveis nos tecidos por vários anos, caracterizando dessa forma a fase crônica da infecção (NEVES, 2003; ELMORE et al., 2010; IHARA; NISHIKAWA, 2014; WHITE et al., 2014).

Os esporozoítas representam a terceira forma infectante, é encontrada em oocistos das fezes de felídeos, os hospedeiros definitivos do parasito, e contaminam o solo, água e vegetais. Eles são esféricos e possuem parede dupla, o que os tornam mais resistentes ao meio ambiente. A liberação desses oocistos pelos felídeos pode ocorrer de 7 a 21 dias após a ingestão de parasitos e, sob condições favoráveis do ambiente, passam por um processo de esporulação, tornando-se infectantes (DUBEY, 2004).

O ciclo de vida de *T. gondii* ocorre em duas fases distintas: assexuada e sexuada. Os felídeos do gênero *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos, pois neles ocorre uma etapa assexuada (merogonia) e uma sexuada (gamogonia). Já em outros animais, como outros mamíferos e aves, ocorre o ciclo assexuado do parasito e são os hospedeiros intermediários do parasito (DUBEY et al., 1998; NEVES, 2003; LUN et al., 2015).

O ciclo tem início com a ingestão pelos felídeos de oocistos que estão dispersos no meio ambiente ou ainda através de cistos contendo bradizoítas. Eles albergam o parasito em suas células intestinais, local onde ele desenvolve seu ciclo enteroepitelial. Qualquer uma das três formas infectantes de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas) passam por um processo de conversão e intensa multiplicação, originando os merozoítas. Estes são liberados após o rompimento das células parasitadas e penetram em novas células, transformando em formas sexuadas masculinas e femininas, que após maturação dão origem aos gametas, denominados microgametas ou macrogametas. Forma-se o ovo ou zigoto, que se desenvolve no epitélio intestinal, e passa a ser envolto por uma camada de parede externa dupla, originando assim os oocistos (DUBEY et al., 1998; NEVES, 2003; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; WHITE et al., 2014). No meio ambiente, em presença de oxigênio (O₂) e temperatura adequados, os oocistos esporulam, em período de um a cinco dias, tornando-se infectantes (DUBEY et al., 1998; LANGONI, 2006; WHITE et al., 2014).

Nos hospedeiros intermediários ocorre apenas a fase assexuada do ciclo, sendo que as formas infectantes podem ser adquiridas através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, ingestão de água, verduras e frutas contaminadas pelos oocistos que ficam dispersos no meio ambiente, ingestão direta de taquizoítas a partir de líquidos orgânicos, transfusão sanguínea, infecção congênita e até por acidentes laboratoriais. Os mecanismos imunológicos do hospedeiro são os responsáveis pela redução da quantidade de parasitos circulantes, assim como a transformação de taquizoítas em bradizoítas, que representa a fase crônica da infecção (DUBEY et al., 1998; NEVES, 2003; LANGONI, 2006).

1.1.2 Cepas de *T. gondii*

A maioria das cepas de *T. gondii* encontradas na América do Norte e na Europa pode ser categorizada em três linhagens clonais bem definidas denominadas de Tipo I (altamente virulenta), Tipo II (moderadamente virulenta) e Tipo III (avirulentas) (BARRAGEM, 2002; NGUYEN et al., 2003; AJZENBERG, 2010; INGRAM et al., 2013).

A maioria dos estudos comportamentais utiliza cepas do tipo II, que são conhecidas por resultar em cargas elevadas de cistos do parasito no cérebro de camundongos e causam correspondentemente elevados níveis de inflamação no cérebro. Isso pode resultar em patologia cerebral ocasionando alterações comportamentais em camundongos infectados (HOWE; SIBLEY, 1995; NGUYEN et al., 2003; AJZENBERG, 2010; INGRAM et al., 2013).

As cepas de tipo I (RH, CAST, VEL) são associadas com a virulência aguda em modelos de camundongos e, em humanos, estão associadas às manifestações clínicas graves de toxoplasmose, incluindo manifestações oculares. Uma característica fundamental de infecções de cepas do tipo I é que elas rapidamente disseminam e chegam a níveis elevados nos tecidos. Os parasitos de cepas do tipo I também demonstram uma capacidade ótima para transmigração *in vivo* atravessando o epitélio intestinal de camundongos e penetrando diretamente dentro da lâmina própria e do endotélio vascular (BARRAGEM, 2002; NGUYEN et al., 2003; AJZENBERG, 2010; INGRAM et al., 2013).

As cepas do Tipo II (ME49, PDS, PLK) e tipo III (CEP, VEG) apresentam uma virulência menor em camundongos e a infecção tem tendência a cronificação da patologia pelo hospedeiro. Nos seres humanos, as cepas do tipo II são comuns em casos de toxoplasmose congênita e em pacientes imunodeprimidos. Já as cepas de tipo I estão

geralmente associadas a manifestações clínicas graves da doença, sendo que a virulência das cepas é um dos fatores que determinam o caráter patogênico das mesmas. A propriedade inerente de parasitos de *Toxoplasma* de regular a sua capacidade migratória provavelmente desempenha um papel importante no estabelecimento de novas infecções e na disseminação seguida de reativação de infecções crônicas (AJZENBERG, 2002).

1.2. Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose é uma zoonose que tem como agente etiológico *T. gondii*. A prevalência da toxoplasmose varia de 20 a 90% na população humana mundial, variando de acordo com os aspectos geográficos, clima, e os hábitos higiênicos e nutricionais de cada região. Embora a infecção por *T. gondii* seja geralmente assintomática nos indivíduos imunocompetentes, a infecção pode ocasionar quadros clínicos graves em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles representados por indivíduos transplantados, submetidos a quimioterápicos ou portadores de HIV, e em crianças infectadas congenitamente (BOIA; CARVALHO-COSTA; SODRÉ, 2008; ALVES et al., 2009; FUGLEWICZ et al., 2016).

Das doenças infecciosas, a toxoplasmose é uma das patologias mais comuns, mais difundida que a malária, a tuberculose e outras infecções e parasitoses que são comumente consideradas como graves ameaças globais à população humana. *T. gondii* é capaz de infectar todas as espécies de mamíferos, além de numerosas espécies de aves (FUGLEWICZ et al., 2016).

Quando a infecção por *T. gondii* acomete embriões ou fetos, esta é conhecida como toxoplasmose congênita, e são relatados cerca de 200.000 casos no mundo a cada ano (ANDER et al., 2018). Nesse tipo de infecção ocorre a transmissão vertical da toxoplasmose quando a mulher adquire a infecção durante a gestação e encontra-se na

fase aguda desta infecção (REMINGTON et al., 2001; KODJIKIAN, 2010), ou pode ser ocasionada quando a infecção na gestante ocorre antes da concepção (VOGEL et al., 1996; CHEMLA et al., 2002, BARBOSA et al., 2008; CHAUDHRY et al., 2014). O parasito apresenta capacidade de migrar através da placenta e se replicar dentro de diferentes tecidos do embrião (LANG et al., 2007; KODJIKIAN, 2010). Além disso, mulheres infectadas cronicamente, quando imunodeprimidas, também podem sofrer a reagudização da doença e posterior infecção transplacentária (RORMAN et al., 2006; MONTOYA; REMINGTON, 2008; FRANCO et al., 2015).

A toxoplasmose congênita é um grave problema de saúde pública, pois pode levar ao aborto espontâneo, nascimento prematuro, morte neonatal, ou seqüelas graves para o feto, como retinocoroidite, calcificações cerebrais, hidrocefalia ou microcefalia, principalmente durante os primeiros dois trimestres (BOIA; CARVALHO-COSTA; SODRÉ, 2008; FRANCO et al., 2011; CASTRO et al., 2013).

Segundo Pappas e colaboradores (2009), a infecção materna primária durante a gestação é responsável por quase toda a infecção fetal. A taxa de transmissão ao feto na primo-infecção é de 25, 54 e 65% no primeiro, segundo e terceiro trimestres, respectivamente. A gravidade da infecção no recém-nascido é dez vezes maior quando a infecção materna ocorre no primeiro trimestre, embora a infecção vertical seja menor nessa fase quando comparada ao terceiro trimestre (MONTANO et al., 2010; GOMES et al., 2011; ROBBINS et al., 2012).

1.3. Resposta imune a *T. gondii*

O controle da infecção trata-se da primeira linha de defesa do organismo a *T. gondii*, que envolve diversos mecanismos da imunidade inata e imunidade adaptativa. A presença de barreiras físicas, que compreende toda a mucosa do trato gastrointestinal,

no caso de transmissões orais, é a primeira linha de defesa apresentada. No entanto, o protozoário pode ultrapassar o epitélio intestinal e disseminar-se para tecidos subjacentes. O parasito tem habilidade para estimular ambas as respostas imunes: celular e humoral. A resposta imune celular é de extrema importância para o hospedeiro, uma vez que auxilia no controle da infecção, por meio de atividades citotóxicas e secreção de citocinas (TIZARD, 2002; BUZONIGATEL; KASPER, 2007; HUNTER; SIBLEY, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014). Os anticorpos apresentam grande importância, mas de forma secundária, pois eles são o ponto chave para o diagnóstico da infecção. Assim diversos tipos celulares participam deste processo de defesa, como as células apresentadoras de antígeno (células dendríticas e macrófagos), células *natural killer* (NK), e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; WILSON et al., 2010; ZHANG et al., 2015).

Após a infecção por *T. gondii*, monócitos, neutrófilos e células dendríticas (CDs) são recrutadas para o local da infecção. Uma das funções mais importantes da resposta imune inata à toxoplasmose é a capacidade de detectar patógenos. Vários estudos também indicam que a imunidade inata e, especialmente a atividade de monócitos inflamatórios, desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra o parasito. Esta resposta não é apenas essencial para a sobrevivência do hospedeiro, mas também cria um ambiente favorável para manter a sobrevivência do parasito por meio do estabelecimento de uma infecção latente crônica (GOV et al., 2013).

Após o estabelecimento da resposta imune inicial e o conseqüente processamento dos antígenos no interior das células apresentadoras de antígeno (APCs), os linfócitos tornam-se ativados e passam a secretar outras citocinas, que podem ativar macrófagos, capacitando-os a destruir microorganismos intracelulares (INNES, 2009).

Os linfócitos TCD8⁺ são caracterizados por sua função citotóxica, a qual é essencial para o controle do parasitismo. Estudos demonstram que a ausência dessa subpopulação celular acelera a mortalidade em camundongos infectados com *T. gondii*, comprovando a importante função desempenhada por células TCD8⁺ no combate do parasito e sobrevivência do hospedeiro (FILISETTI; CANDOLFI, 2004; MELO et al., 2011). Já os linfócitos TCD4⁺ regulam diferentes mecanismos imunes contra o parasito e, após sua estimulação, se diferenciam em subpopulações de linfócitos T *helper*, como linfócitos T *helper* 1 (Th1), linfócitos T *helper* 2 (Th2), linfócitos T *helper* 17 (Th17) e células T reguladoras (Treg), os quais diferem uns dos outros segundo o perfil de citocinas que secretam (COMBE et al., 2005; JONGERT et al., 2010).

As respostas relacionadas às células T CD8⁺ contra *T. gondii* são potencializadas pelo sinergismo das células T CD4⁺, embora há relato de que a redução de células T CD4⁺ não apresente uma diminuição da magnitude da resposta de células T CD8⁺ durante a fase inicial da imunidade contra *T. gondii* (TIZARD, 2006; DUPONT et al., 2012). A expansão das células T e a ativação de células T CD4⁺ são fatores necessários para a manutenção de células T CD8⁺ para que essas realizem suas funções efetoras durante a fase crônica da infecção. Assim, as células TCD8⁺, também conhecidas como células T citotóxicas, podem destruir taquizoítas e células infectadas por *T. gondii*. As respostas imunes mediadas por células e anticorpos atuam juntas para assegurar a eliminação do parasito (COMBE et al., 2005; TIZARD, 2006; DUPONT et al., 2012).

Conforme descrito anteriormente, a resistência da infecção, orquestrada pelas células Th1 a *T. gondii*, é mediada por uma típica resposta imune celular. Ocorre secreção de citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN)- γ , fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), interleucina (IL)-6, IL-12 e fator de necrose tumoral

(TNF), as quais são responsáveis pela resposta imune efetora contra *T. gondii* (ABOUBACAR et al., 2004; CASTRO et al., 2013; FERREIG; NISHIKAWA, 2016). As células Th2 são as responsáveis pela secreção de citocinas antiinflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004) e as células Treg secretam fator transformador de crescimento (TGF)- β e IL-10, capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade citotóxica de células NK e a maturação de células dendríticas (SAKAGUCHI, 2005; AKBAR et al., 2007).

Durante a infecção, os macrófagos, neutrófilos, e células dendríticas produzem IL-12, a qual ativa os linfócitos TCD4⁺ para produzir o IFN γ . IFN γ desencadeia diversos mecanismos antiparasitários em macrófagos e células NK, tais como a produção de reativos intermediários de oxigênio e óxido nítrico e, portanto, é considerada a principal citocina envolvida no controle da infecção por *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008; JOHN et al., 2010). TNF- α , outra citocina pró-inflamatória que também está envolvida nos mecanismos antiparasitários, é secretada por diferentes tipos celulares em resposta a uma lesão ou infecção, e coordena os sinais pró-inflamatórios precoces durante a resposta imune inata, além de ser responsável por muitos dos efeitos sistêmicos associados. Esta citocina apresenta a capacidade de controlar a invasão, mas não a proliferação celular de *T. gondii*. Portanto pode desempenhar um papel modulador da atividade biológica e pode ser considerado um marcador confiável da atividade inflamatória (DIEZ-RUIZ, 1995; BESSA et al., 2012). A citocina IL-6 representa outros mecanismos de defesa do organismo à infecção parasitária, sendo capaz de proteger o organismo contra a infecção parasitária. É produzida por um grande número de células, incluindo macrófagos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos, células mielomatosas e neoplásicas (FILISSETTI, 2004). Finalmente, MIF representa outra citocina importante na defesa do hospedeiro contra *T. gondii*. Esta citocina é sintetizada

por uma variedade de células, incluindo macrófagos, células dendríticas e células T (TERRAZAS et al., 2010).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígenos (APCs) e sua ativação ocorre pelo IFN- γ que também induz mecanismos oxidativos, não oxidativos e a secreção de enzima degradante de triptofano. Os macrófagos são importantes para a destruição de microorganismos intracelulares já que produzem óxido nítrico (ON), substância altamente tóxica para alguns protozoários. Contudo, alguns protozoários podem sobreviver dentro dos macrófagos. Os neutrófilos são outra fonte de IL-12 durante a infecção por *T. gondii*, pois eles contêm IL-12 pré-armazenada, podendo secretar essa citocina *in vitro* e *in vivo* em resposta a *T. gondii*. Além disso, há relatos de que a depleção de neutrófilos resulta em diminuição dos níveis de IL-12 e aumento da replicação do parasita. As células NK são outra população celular envolvida na imunidade inata de *T. gondii*. Essas células secretam IFN- γ e parecem agir juntamente com os macrófagos induzindo o início da resposta imune adaptativa (HUGHES, 1988; BARBOSA et al., 2008; GOLDSZMID et al., 2012; DUPONT et al., 2012; CASTRO et al., 2013).

A produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios pode resultar em patologias graves, e, portanto, os efeitos da imunidade mediada por células contra o parasito podem ser graves se não houver um controle da resposta imune. Esse controle é realizado por algumas citocinas que também são liberadas pelas células do sistema imune (HANNA et al., 2000; BARBOSA et al., 2008). A IL-10 e seus receptores são necessários para limitar a patologia imune durante o curso da infecção. Esta citocina é produzida por macrófagos e também por linfócitos e, estudos recentes demonstraram a capacidade de *T. gondii* para modular a resposta imune do hospedeiro através de sua

ação sobre a atividade de proteínas específicas do parasita (SOMMERVILLE et al., 2013).

Quanto à imunidade humoral, inicialmente ocorrem altos níveis de IgM. Eles são os primeiros anticorpos a aparecerem, são característicos da fase aguda ou recente da infecção, embora, por meio de técnicas de alta sensibilidade, podem ser detectadas no soro humano por anos (CORREA; CORREA, 1992). Após algumas semanas, a IgM começa a diminuir e sobem os títulos de IgG. Essa classe de imunoglobulina é a segunda a aparecer na toxoplasmose. O anticorpo pode apresentar papel de citotoxicidade, porém não é capaz de combater a infecção, porque os cistos permanecem e o hospedeiro se torna portador latente de *T. gondii* (CORREA; CORREA, 1992).

1.4. Resposta imune na gestação

Uma gestação bem sucedida está associada a não rejeição de antígenos fetais pela mãe, o que é conseguido através de vários mecanismos imunológicos na interface materno-fetal. Exemplos típicos incluem inativação de células NK através da expressão de HLA-G, a depleção de triptofano por indoleamine 2,3-dioxigenase, a expansão do subconjunto de células T reguladoras durante a gestação, além da mudança de uma resposta imune do tipo Th1 para Th2 (ALUVIHARE et al., 2004).

Os hormônios da gestação são de grande importância para a manutenção da mesma e também influenciam o sistema imunológico. O Estradiol é capaz de estimular a expansão de células Treg, e diminuir a produção de IL-17 por células T. A elevação da progesterona durante a gestação inibe o desenvolvimento de respostas imunes Th1 e em sinergia com a galectina-1 (Gal-1) esta envolvida na manutenção da gestação (JOACHIM et.al., 2003; ZENCLUSSEN, 2013).

Conforme mencionado anteriormente, o principal mecanismo de defesa contra *T. gondii* é mediado por uma resposta imune de tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, durante a gestação, a resposta imune materna muda preferencialmente para o perfil do tipo Th2, com a secreção predominante de citocinas anti-inflamatórias, que permitem a tolerância ao feto e manutenção da gestação. Assim este microambiente anti-inflamatório torna-se favorável para a replicação de parasitos, incluindo *T. gondii* (SAITO, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2009; CASTRO et al., 2013).

Inúmeras funções são atribuídas às citocinas durante a gestação. Elas participam do processo de manutenção do corpo lúteo, adesão e implantação do blastocisto no endométrio, desenvolvimento placentário e fetal, além de mediar mecanismos imunes tolerantes ao concepto (SCHAFFER-SOMI, 2003). Durante a gestação ocorre preferencialmente a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , essas, por sua vez, apresentam a capacidade de causar maior susceptibilidade à toxoplasmose, ou seja, aumentando assim a probabilidade de ocorrer uma transmissão congênita, podendo levar a complicações gestacionais (LANGONI, 2009). Por outro lado, há a produção de citocinas pró-inflamatórias como MIF, IL-6, IFN γ , IL-12 e TNF tanto por células maternas como fetais. Essas citocinas são sintetizadas principalmente por células da decídua e da placenta fetal, especificamente o trofoblasto (SAITO, 2001).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 é de extrema importância em todo processo de implantação embrionária e defesa do organismo às infecções, sendo capaz de estimular algumas vias de sinalização, como também interferir na secreção de outras citocinas (FITZGERALD, et al., 2005; GUIRELLI et al., 2015). É uma citocina de caráter protetor durante o curso inicial da infecção por *T. gondii*. A IL-6 é fundamental

no processo de implantação de embriões e nos estágios iniciais da gestação, essa citocina pode influenciar também na interface materno fetal para alterar parâmetros que influenciam no crescimento fetal (ROBERTSON, 2000; DESAI et al., 2002).

Além da IL-6, MIF tem participação nos processos de implantação embrionária e outras funções reprodutoras (WEINBERG, 1984; ARCURI et al., 1999). O papel do MIF é agir em um local de inflamação para contrabalancear os efeitos inibidores de esteróides na resposta imune (BUCALA, 1998; SOMMERVILLE et al., 2013). A ação de MIF está relacionada à indução da ativação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK)1/2 que é dependente de proteína quinase A e encontra-se associado com o aumento da atividade enzimática da fosfolipase citoplasmática A2 (cPLA2) (DAUN; CANNON, 2000). Estudos recentes relatam que MIF e ERK1/2 são mediadores importantes durante infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal (BARBOSA et al., 2014).

1.5. Vias de sinalização dependente de ERK1/2

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são proteínas que convertem estímulos extracelulares em uma ampla gama de respostas celulares (CARGNELLO, ROUX, 2011). Essa família apresenta regulação que tem sido conservada durante a evolução dos organismos unicelulares, até os mais complexos organismos incluindo os humanos (WIDMAN, 1999; DAOUD, 2005). Os organismos multicelulares possuem múltiplas vias de MAPK, que regulam de forma coordenada mitose, expressão gênica, metabolismo, embriogênese, motilidade, sobrevivência, diferenciação, proliferação celular e apoptose (CARGNELLO, ROUX, 2011). As subfamílias mais bem conhecidas são as ERK 1/2, c-JUN e p-38 (HAN et al., 1994; JIANG et al., 1996; LECHNER et al., 1996; GOEDERT et al., 1997, DAOUD, 2005).

Estão relacionadas também à conversão de um grande número de estímulos extracelulares e condições ambientais nas respostas celulares e na regulação do processo inflamatório (PEARSON et al., 2001; DAOUD, 2005).

Na via das MAPKs, a treonina e a tirosina formam o ciclo de ativação das quinases a serem fosforiladas. Cada grupo de MAPKs convencionais é composto de um conjunto de três quinases evolutivamente conservadas, com agilidade sequencial: uma MAPK, uma MAPK kinase (MAPKK) e uma MAPKK quinase (MAPKKK) (CARGNELLO, ROUX, 2011). Dentro deste sistema, as MAPKs são ativadas quando um grupo fosfato é ligado a resíduos de Thr–Tyr (treonina-tirosina) conservado que está localizado no subdomínio da quinase (MARTINEZ; PETERSEN, 2014). A ativação da MAPKKK leva à ativação da MAPKK e, além disso, à ativação da MAPK por dupla fosforilação nos resíduos Thr e Tyr. A via ERK1/2 funciona através da ativação de Raf (MAPKKK), que através da fosforilação ativa MEK1/2 (MAPKK), que depois irá fosforilar e ativar ERK1/2 (MAPK) (CARGNELLO, ROUX, 2011; MARTINEZ; PETERSEN, 2014).

A primeira via descrita de MAPKs em mamíferos foi a via de ERK 1/2. As vias ERK 1 e 2 partilham de uma homologia de aminoácidos de cerca de 83% e são expressas em graus diferentes em todos os tecidos que atuam. Essa subfamília de MAPKs é fortemente ativada por fatores de crescimento, soro, citocinas, stress osmótico e também pela desorganização dos microtúbulos (CHEN et al., 2001). Os substratos ERK1/2 estão localizados tanto no citoplasma como na fosforilação pós-ERK1/2 no núcleo. A translocação nuclear de ERK1/2 é necessária como requisito para respostas biologicamente relevantes (MARTINEZ; PETERSEN, 2014).

Alguns trabalhos demonstraram que a via de sinalização intracelular ativada por ERK1/2 e a produção de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas 2 (PGE₂) em

células trofoblásticas humanas BeWo dependem da concentração de MIF: concentrações baixas de MIF desencadeiam a fosforilação ERK1/2 e liberação de PGE₂, promovendo uma susceptibilidade maior a *T. gondii* e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que as altas concentrações de MIF não provocam a fosforilação ERK1/2 ou a liberação de PGE₂, que controlam a carga parasitária e, portanto, mostram a importância desses mediadores neste modelo de células trofoblásticas humanas (BARBOSA et al., 2014).

1.6. Células Trofoblásticas

Células trofoblásticas são células especializadas na proliferação, diferenciação. São responsáveis pela aposição, adesão e invasão da mucosa uterina pelo embrião no curso da gestação. A regulação destes eventos celulares é crucial para o desenvolvimento normal da placenta humana. De fato, anomalias nestes processos estão associadas com a fisiopatologia das complicações relacionadas com a gestação, como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino e aborto espontâneo (LIM et al., 1997; CROCKER et al., 2003; LANGBEIN et al., 2008; COSTA et al., 2016). A eficácia das interações materno-fetal, que se inicia durante a implantação embrionária, é fundamental para uma gestação de sucesso. A perfusão placentária requer a invasão controlada de células trofoblásticas até as artérias espiraladas (CANIGGIA et al., 1997). O processo de implantação embrionária é um processo fisiológico complexo, dependente de uma série de eventos-chave, incluindo a aposição de blastocisto e a adesão ao epitélio luminal, uma extensa degradação e remodelação da matriz extracelular, a invasão das células trofoblásticas no endométrio e secreção de citocinas locais para ativar o diálogo entre o endométrio e implantação do blastocisto (ACHACHE; REVEL, 2006).

A placenta é um órgão quimérico e existem graus variados de interações entre células trofoblásticas e as células maternas com as quais entram em contato. Em seres humanos, e outros mamíferos com placenta hemocorial, células trofoblásticas são banhadas diretamente pelo sangue materno extravasado. Em humanos e outros primatas, a camada de células trofoblásticas diferencia-se em duas populações celulares distintas: o citotrofoblasto, que corresponde a uma monocamada mononuclear e o sinciciotrofoblasto multinucleado que deriva da fusão de células do citotrofoblasto. Essas duas populações celulares estão presentes em dois tipos de vilos coriônicos: vilos flutuantes e de ancoragem (CANIGGIA et al., 1997).

Os vilos flutuantes, que representam a grande maioria do vilos corial, são banhados por sangue materno extravasado presentes nas lacunas. Vilos de ancoragem correspondem aos vilos coriônicos que se fixam na mucosa uterina. A camada de células que se fixa na mucosa uterina é formada por células típicas do citotrofoblasto e exercem importantes atividades funcionais. Vilos coriônicos realizam trocas de gases e de nutrientes para o embrião em desenvolvimento, bem como permite o intercâmbio de outras moléculas como anticorpos maternos (CANIGGIA et al., 1997). Além das funções nutritivas, as células trofoblásticas presentes nos vilos são também responsáveis por exercer inúmeras atividades imunomodulatórias durante a gestação (FERRO, 2000).

A invasão do trofoblasto na mucosa uterina é um evento chave para desenvolvimento da placenta. A invasão insuficiente de células trofoblásticas na decídua e na remodelação inadequada dos vasos uterinos está associada com pré-eclâmpsia; já a invasão exagerada da mucosa uterina pelas células trofoblásticas resulta na formação da placenta acreta. Ambas as situações são potencialmente graves, podendo levar tanto a morte fetal quanto a morte materna (LIM et al., 1997; ROBBINS et al., 2011; CHENG et al., 2013).

No início da placentação, células de citotrofoblasto presentes nas vilosidades flutuantes proliferam e se diferenciam por fusão para formar a camada de sinciciotrofoblasto multinucleados. Células do citotrofoblasto têm capacidade fisiogênica e formam a camada de sinciciotrofoblasto, ou para atravessar o sincício nos pontos de ancoragem e formar colunas de várias camadas de células citotrofoblásticas extravilosas não-polarizadas (CANIGGIA et al., 1997; FRANCO et al., 2011; ROBBINS et al., 2011).

A fusão célula a célula é um evento crucial na formação do sincício multinucleado e faz parte da biologia normal da camada de sinciciotrofoblasto da placenta humana. O sinciciotrofoblasto tem a capacidade de produzir hormônios que são necessários para a manutenção da gestação e apresentam um papel de proteção ao feto em relação ao sistema imune materno (OMATA et al., 2013). O sinciciotrofoblasto é a uma superfície multinucleada que é banhada pelo sangue materno, e constitui parte da interface materno-fetal. Essas células estão expostas à circulação de patógenos no sangue materno e aparecem como o único mecanismo de resistência contra a invasão microbiana (ZELDOVICH et al., 2013). As subpopulações de células trofoblásticas, citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto, além das células endoteliais e mesenquimais fetais, constituem a barreira placentária. Esta barreira física e fisiológica é responsável pelas trocas de nutrientes, gases e produção hormonal. No entanto, esta barreira placentária pode permitir a passagem de microorganismos patógenos como *T. gondii* (ROTH, 1996; FERRO, 2000; GOMES et al., 2011, ROBBINS et al., 2012).

As células trofoblásticas extravilosas invadem a parede uterina no primeiro trimestre e migram em direção às artérias espiraladas do endométrio e miométrio, onde remodelam a camada de musculatura lisa, interpõem-se entre as células decíduais e, gradualmente passam a revestir a parede vascular. Isto resulta na conversão das artérias

de calibre estreito em artérias útero-placentários distendidos, aumentando assim o fluxo de sangue para a placenta e permitindo um fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes para o feto em desenvolvimento (CANIGGIA et al., 1997; ROBBINS et al., 2012).

Estudos realizados por Robbins e colaboradores (2012) sugerem que o trofoblasto extraviloso é a principal porta de entrada para a infecção por *T. gondii*, observando que cerca de 80% dos parasitos estavam nesta região, mesmo que esta população de células trofoblásticas represente apenas 5% da área de superfície dos explantes placentários. Já na região do sinciotrofoblasto, a infecção foi significativamente menor e poucos parasitos foram localizados nessa região. Assim este grupo sugere que o revestimento externo dos vilos flutuantes, formado por células trofoblásticas sinciciais seja efetivamente um obstáculo para a infecção por *T. gondii* no microambiente placentário (ROBBINS et al., 2012).

Outro estudo recentemente publicado demonstrou a resistência do sinciotrofoblasto à infecção por *T. gondii* (ANDER et al., 2018). Os autores utilizaram células primárias de trofoblasto humano (PHT) isoladas de placentas a termo e explantes de vilos coriônicos de metade do período gestacional humano para determinar os mecanismos desencadeados pelo trofoblasto humano contra a infecção por *T. gondii*. Os sinciotrofoblastos placentários restringiram a infecção por *T. gondii* em estágios distintos do ciclo lítico do parasita e também durante a replicação intracelular, apresentando uma característica celular de maior resistência à infecção quando comparado aos demais tipos celulares (ANDER et al., 2018).

As citocinas desempenham papel crucial no curso da gestação tanto para o desenvolvimento da placenta quanto na modulação da reatividade imune materno para prevenir a rejeição do concepto (RAGHUPATHY et al., 2012). O estado imunológico

materno mais propício a uma gestação de sucesso está associado a um padrão de resposta do tipo Th2. Alguns tipos de complicações na gestação estão associados com uma predominância de resposta do tipo Th1. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que induz a imunidade humoral vigorosa (MOSMANN; SAD, 1996; BARBOSA et al., 2007; CASTRO et al., 2013).

Algumas citocinas e fatores de crescimento são importantes para a implantação do embrião, enquanto que as fases posteriores à implantação, incluindo a diferenciação de trofoblasto ao longo da via invasiva e a formação de sincícios são moduladas por outros fatores de crescimento. Os membros da família de TGF- β são fatores de crescimento conhecidos por inibir a invasão celular. TGF- β , que existe em três isoformas em seres humanos (β 1, β 2, β 3), é produzido na interface materno fetal e acredita-se ser um fator importante que regula a invasão trofoblásticas no útero (LYSIAK et al., 1995; BARBOSA et al., 2007; CASTRO et al., 2013). TGF- β é importante para a manutenção da gestação, propiciando um local imunologicamente privilegiado para o feto. Esta citocina é detectada em placentas humanas e as suas ações incluem a inibição de células produtoras de citocinas inflamatórias e a função citotóxica das células natural killer (LYSIAK et al., 1995; JONES et al., 2006).

Além de TGF- β , outra citocina de importância crucial na interface materno-fetal é IL-6, uma citocina multifuncional produzida por citotrofoblastos e regula diversas funções, dentre elas, migração, invasão, diferenciação e proliferação do trofoblasto. Em macrófagos, IL-6 sintetizada se acumula no complexo de Golgi e é excretada durante a reciclagem de endossomos (GOYAL et al., 2013). Castro e colaboradores (2013) demonstraram que células THP-1 infectadas ou não com *T. gondii* secretam altos níveis de IL-6 após a estimulação com sobrenadante de células BeWo. Uma vez que esta citocina pode propiciar a proliferação e invasão do trofoblasto através

do tecido decidual, estes resultados sugerem que monócitos na interface materno fetal podem desempenhar um papel modulador no sítio de implantação, promovendo sinais apropriados, que facilitam o crescimento e invasão do trofoblasto na mucosa uterina (CASTRO et al., 2013).

1.7. Sinciotrofoblasto

A fusão sincicial do citotrofoblasto em sinciotrofoblasto é um processo de extrema importância na implantação e placentação. O sinciotrofoblasto é um tecido multinuclear que compreende a camada mais externa dos vilos flutuantes na placenta humana e tem papel fundamental como barreira sanguínea materna (PÖTGENS et al., 2004; ANDER et al., 2018). Essa camada celular desempenha um papel importante durante a gestação, uma vez que é o local de numerosas funções da placenta, incluindo troca de nutrientes e de íons, a síntese de hormônios esteróides e peptídeos necessários para o crescimento e desenvolvimento fetal (EATON, 1993; OGREN, 1994; PIDOUX et al., 2012), como a progesterona e gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônios essenciais para a manutenção da gestação humana. O sinciotrofoblasto multinucleado é repostado durante toda a gestação por meio de um processo de renovação contínua, incluindo a proliferação de citotrofoblasto mononucleares subjacentes, a fusão dos citotrofoblasto. Formação inadequada e regeneração desse tecido levam a várias patologias da gestação, como a restrição de crescimento intra-uterino e pré-eclâmpsia, que pode levar ao parto prematuro, a fim de evitar a morte fetal (PIDOUX et al., 2012).

A formação do sinciotrofoblasto pode ser reproduzida *in vitro* utilizando modelos celulares. Células de coriocarcinoma, isto é, células BeWo, são capazes de se fundir na presença de cAMP para formar um sincício multinucleado, a elevação de cAMP intracelular através da estimulação com forskolin induz a fusão celular por

células células BeWo (OMATA et al., 2013). As células purificadas do citotrofoblasto (CT), cultivadas em placas de plástico, permite-nos acompanhar a diferenciação morfológica e funcional dos vilos (MILLER et al., 2005; PIDOUX et al., 2012).

Diferenciação do citotrofoblasto para o sinciotrofoblasto é um processo necessário para o desenvolvimento de uma placenta funcional. A diferenciação do citotrofoblasto é caracterizada tanto por alterações bioquímicas e morfológicas, incluindo a regulação positiva e expressão de gonadotrofina coriônica humana e lactogênio placentário, a produção de estrogênios e de progesterona, e fusão de células, resultando na formação de sincícios (OMATA et al., 2013).

1.8. Linhagens Celulares

As células BeWo são derivadas de coriocarcinoma humano e foi isolada primeiramente em 1968 por Pattillo e Gey. Essas células são amplamente utilizadas como um modelo *in vitro* para fusão intercelular e diferenciação de trofoblasto. Quando essas células estão em cultura elas geram uma matriz extracelular rica em laminina e tem capacidade de secretar diversas citocinas como IL-6, IL-8, IL-4 e IL-10 (APLIN, 1998). Sob condições normais de cultura, as células BeWo crescem com características semelhantes às de citotrofoblasto (XU et al., 1999). Vários estudos realizados *in vitro* têm sido desenvolvidos a fim de estabelecer o papel de células trofoblásticas em estudos sobre imunologia da gestação, particularmente na presença de parasitas intracelulares, como *T. gondii*. As células BeWo são altamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* e não são capazes de controlar a replicação do parasita, mesmo na presença de IFN- γ exógeno (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). Assim a linhagem de células BeWo podem ser utilizadas como um bom modelo experimental em estudos

para estabelecer o papel de células trofoblásticas na modulação do perfil imune durante a gestação, principalmente na presença de protozoários como *T. gondii*.

As células BeWo sincializadas apresentam a capacidade de simularem características semelhantes às da região do sinciotrofoblasto da placenta humana. Normalmente são utilizadas em experimentos por se diferenciarem em BeWo sinciciais, por meio de indução por uma variedade de reagentes, tais como fatores de crescimento, metotrexato, análogos de AMP cíclicos, ou forskolina, um estimulador da adenilato ciclase (XU et al., 1999).

As células HTR-8/SVneo são consideradas o modelo mais próximo das células citotrofoblásticas extravilosas. Essas células em humanos são responsáveis pela ancoragem da placenta no sítio de implantação uterina, na decídua, onde estão justapostos às células imunes maternas. Além do mais, a fisiologia do trofoblasto extraviloso é essencial para o estabelecimento da interface materno-fetal capaz de sustentar o crescimento e desenvolvimento fetal adequado. (KOHLENER; BRIDSON, et al., 1971; NAGAMATSU, SCHUST, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Existem dados na literatura que sugerem que as diferentes populações de células trofoblásticas (citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e trofoblasto extraviloso) apresentam diferenças de susceptibilidade à infecção por *T. gondii* (ROBBINS et al., 2012). Com a execução da presente proposta, pretende-se avaliar os possíveis mecanismos celulares envolvidos neste fenômeno, bem como adicionar dados para melhor entendimento das interações presentes na interface materna fetal. O entendimento das complexas interações operantes no micro-ambiente placentário na presença de *T. gondii* potencializará a ampliação do leque de ferramentas para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas capazes de interferir no controle da infecção fetal por *T. gondii* sem comprometer o sucesso gestacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a susceptibilidade das células trofoblásticas BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo à invasão parasitária por *T. gondii*, bem como investigar possíveis mecanismos intracelulares e imunológicos envolvidos nesse processo nos diferentes tipos celulares.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar comparativamente o índice de infecção e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo;
- b) Mensurar comparativamente a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias produzidas por células BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii*;
- c) Analisar a expressão de proteínas intracelulares da família MAPKs (ERK1/2, p38 e cJUN) nas diferentes populações de células trofoblásticas (BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo) infectadas ou não por *T. gondii*;
- d) Verificar índice de infecção e proliferação intracelular de *T. gondii* nas três populações celulares mediante tratamento com os inibidores de ERK1/2;
- e) Mensurar comparativamente a produção de citocinas pró e antiinflamatórias produzidas por células BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* após a inibição das vias de sinalização das MAPKS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células HTR-8/SVneo e BeWo

As células da linhagem HTR-8/SVneo, originadas do citotrofoblasto extraviloso humano, foram gentilmente cedidas pela Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Estas células são imortalizadas pela transfecção de células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação com um plasmídeo contendo o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (GRAHAM et al., 1993). Já as células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo), modelo experimental de trofoblasto viloso, foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). Ambas as linhagens celulares foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm², contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) – meio completo - em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Para o repique das células, um novo meio de cultura foi adicionado ao frasco e, com auxílio de 0,25% tripsina - 0,02% EDTA, as células foram retiradas, transferidas para tubos de 15ml e centrifugadas a 400 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o “pellet”, contendo as células, foi ressuspenso em 1ml de meio com soro e distribuído em dois novos frascos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento (soro bovino fetal e em 5% de DMSO).

4.2 Manutenção *in vitro* da cepa RH de *T. gondii*

Os parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos em células BeWo cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de SBF. Quando a maioria das células encontravam-se lisadas pelo parasito, o meio do frasco de cultivo contendo parasitos em suspensão foi transferido para tubos de 15ml e centrifugado a 400 g por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “*pellet*”, contendo os parasitos, foi homogeneizado e distribuído em novos frascos contendo células não-infectadas.

4.3 Diferenciação de células BeWo em sinciciotrofoblasto

No processo de obtenção das células de sinciciotrofoblasto, as células BeWo foram submetidas ao processo de sincicialização (OMATA et al., 2013). As células foram cultivadas em placas de 6 poços ($1,5 \times 10^5$ células/2000 μ L/poço) em meio completo durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com as seguintes condições: (1) 20 μ M forskolin (Sigma), (2) 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma), (3) 50 nM de PMA, ou (4) 20 μ M forskolin mais 10 nM de PMA, ou ainda (5) 20 μ M forskolin mais 50 nM de PMA por 24 ou 48 horas adicionais. As células foram então colhidas, centrifugadas a 400 g durante 5 minutos, homogeneizadas e lisadas em gelo com tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM de EDTA, 0,5% de Triton X-100, 10% de glicerol, 1 mM de ditioneitol, e NaCl 200 mM) suplementado com um coquetel de inibidor de protease (Complete®, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha), 1 mM de ortovanadato de sódio e 1 mM de fluoreto de sódio (ambos de Sigma). Após centrifugação a 13.000 g durante 15 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram recolhidos e a concentração da proteína total foi mensurada pelo

ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). As proteínas totais foram submetidas a eletroforese e posteriormente à técnica de *Western Blotting* para analisar a expressão da proteína Sincicina, uma proteína preferencialmente encontrada em células de sinciciotrofoblasto (OMATA et al., 2013).

Em paralelo, para verificar o processo de fusão celular, a medição da área celular e do diâmetro foi feita usando o microscópio de captura. Para este fim, as células BeWo foram tratadas com 20 μ M de forskolin mais 10 nM de PMA, como descrito acima. As células foram contadas para determinar o índice de sincicialização como a relação entre o número de núcleos de sincicio (estruturas fundidas) e o número total de núcleos. Um total de 400 células foram contadas por lâmina analisada. Esse resultado foi multiplicado por 100 e esse valor correspondeu ao índice de sincicialização (OMATA et al., 2013). Posteriormente, o índice de fusão celular foi calculado como a relação entre o número de núcleos sinciciais e os núcleos citotrofoblásticos divididos por 100 (OMATA et al., 2013).

4.4 Ensaio de proliferação de *T. gondii* em células BeWo (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo

As células BeWo (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) foram cultivadas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm em placas de 6 poços ($1,5 \times 10^5$ células/2000 μ L/poço) em meio completo durante 24 horas. Em seguida, as três populações de células foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em proporção de 5 parasitos por célula (5:1) e mantidas nas mesmas condições de cultura como descrito acima por 24 horas adicionais. Após esse

processo, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

As lamínulas com células aderidas foram lavadas com PBS estéril, fixadas em 10% de formalina tamponada com fosfato durante 2 horas e coradas com 1% de azul de toluidina (Sigma) durante 3 segundos. Em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e as células foram examinadas sob um microscópio de luz para verificar o índice de infecção (porcentagem de células infectadas por 100 células examinadas) e proliferação intracelular de *T. gondii* (número total de parasitos em 100 células infectadas) (BARBOSA et al., 2008). Fotomicrografias de células infectadas coradas foram obtidas por microscópio de luz. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

4.5 Dosagem de citocinas em sobrenadante de células BeWo (citotrofoblasto e sinciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo, infectadas ou não por *T. gondii*

As citocinas humanas (MIF, TGF- β 1, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ e TNF) foram mensuradas nos sobrenadantes das células BeWo (sinciotrofoblasto e citotrofoblasto) e HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA, ou R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Os dados foram mostrados em pg/mL e o limite de detecção para cada citocina foi calculado de acordo com a curva padrão (IL-12p70: 7,8 pg/mL; IL-6: 4,7 pg/mL; TNF: 7,8 pg/mL; MIF: 7,8 pg/mL; IFN- γ : 4,7 pg/mL; IL-10: 7,8 pg/mL; TGF- β 1: 125 pg/mL).

4.6 Análise da expressão das proteínas intracelulares MAPKs por *Western blotting* em células BeWo (citotrofoblasto e sinciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii*

As células BeWo e HTR-8/SVneo foram retiradas dos fracos de cultura, centrifugadas, ressuspensas em meio a 10% de SBF e contadas em câmara de Neubauer para a realização do plaqueamento. As células inviáveis foram excluídas pela coloração com azul de trypan 0,4% e ajustadas para concentração de 1×10^6 células a cada 1000 μ l de meio a 10% de SBF. Realizou a transformação das células BeWo em sinciotrofoblasto e em seguida as três linhagens celulares foram cultivadas separadamente em placas de 6 poços por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente as células BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo foram infectadas ou não por *T. gondii* na proporção de 5 parasitos por célula (5:1) e mantidas nas mesmas condições descritas acima. Após esse processo, as células aderidas foram coletadas e passadas pelo processo de criólise para posterior armazenamento e realização do *Western Blotting*. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

As amostras de proteínas totais (50 μ g) obtidas a partir das células lisadas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições de desnaturação (SDS-PAGE) a 12% e as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas marcadas com proteína foram incubadas em tampão de bloqueio [4% leite em pó desnatado desidratado em 100 ml de TBS (Tris 25 mM, NaCl 0,15 M e Tween 20 a 0,1%, pH 7,4)] durante 1 hora à temperatura ambiente e posteriormente foram incubadas em um período de 12 horas com os anticorpos: anti-ERK1/2 fosforilada (R&D Systems) (1:1000), anti-p38 fosforilada (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-C-Jun

fosforilada camundongo (1:1000) (Millipore, Darmstadt, Alemanha), anti-sincicina (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), e anti-GAPDH (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), todos adicionados em tampão TBS. Em seguida, as membranas foram lavadas com o tampão TBS e incubadas com os respectivos anticorpos secundários marcados com peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) diluídos a 1:3000 em tampão TBS com 2 % leite em pó desnatado desidratado durante 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi revelada pela quimioluminescência (ECL SuperSignal kit, Thermo Scientific) e análises de densitometria foram realizadas no ChemiDoc (BioRad, CA, EUA) para determinar a intensidade média das bandas. Os dados foram demonstrados como a densidade relativa da relação entre a expressão de MAPKs fosforilados ou sincicina com bandas GAPDH (controle endógeno).

4.7 Ensaio de proliferação de *T. gondii* em células BeWo, BeWo sincicializada e HTR-8/SVneo após a inibição da via de sinalização de ERK1/2

As células BeWo (citotrofoblasto e sinciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) foram cultivadas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm em placas de 6 poços ($1,5 \times 10^5$ células/2000 μ L/poço) em meio completo durante 24 horas. Em seguida, as três populações de células foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em proporção de 5 parasitas por célula (5:1) e mantidas nas mesmas condições de cultura como descrito acima por 24 horas adicionais. Em paralelo, as células foram cultivadas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm em placas de 6 poços, como descrito acima durante 24 horas, tratados ou não com o inibidor de ERK1/2 (PD98059, 10 μ M) e, após 3 horas, foram infectados com *T. gondii* (5:1) e incubadas por 24 horas

adicionais. Após esses procedimentos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

As lamínulas contendo células aderidas foram lavadas com PBS estéril, fixadas em 10% de formalina tamponada com fosfato durante 2 horas e coradas com 1% de azul de toluidina (Sigma) durante 3 segundos. Em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e as células foram examinadas sob um microscópio de luz para verificar o índice de infecção (porcentagem de células infectadas por 100 células examinadas) e proliferação intracelular de *T. gondii* (número total de parasitas em 100 células infectadas) (BARBOSA et al., 2008). Fotomicrografias de células infectadas coradas foram obtidas por microscópio de luz. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

4.8 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA com teste posterior de comparação múltipla Kruskal-Wallis usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Diferenciação das células BeWo em sinciciotrofoblasto

Para comprovarmos que as células BeWo foram transformadas em células de sincitotrofoblasto, *Western Blotting* foi realizado para avaliar a expressão da proteína de sincicina (60 kDa). Houve um aumento na expressão da sincicina após 24 horas de tratamento, sendo que o tratamento mais eficaz que garantiu essa sincicialização foi com 20 μ M de forskolin mais 10 nM de PMA. O aumento na expressão de sincicina é indicativo de um processo de fusão e diferenciação celular (Fig. 1A). Outro fator analisado que poderia indicar o processo de sincicialização foi a avaliação da área celular e dos diâmetros. As células sincicializadas de BeWo (sinciciotrofoblasto) mostraram uma área e diâmetros celulares significativamente maiores em comparação com as células não sincicializadas (citotrofoblasto) (Fig. 1B). Além disso, a contagem do núcleo sincicial mostrou que cerca de 70% das células que se tornaram sinciciotrofoblasto tinham mais de um núcleo (Fig. 1C).

5.2. Células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *T. gondii*

Para investigar a susceptibilidade das células BeWo (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto) e HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) à infecção por *T. gondii*, essas células foram infectadas com taquizoítos da cepa RH e os parasitos foram contados usando microscópio de luz, através dessa contagem obtivemos dados referentes ao índice de infecção e ao número total de parasitos intracelulares (Fig. 2).

Das três linhagens analisadas, observamos uma maior porcentagem de células infectadas (Fig. 2A) e número total de parasitos intracelulares (Fig. 2B) em células HTR-8/SVneo quando comparadas com ambas as células BeWo (citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto) ($P < 0,05$). Além disso, as células BeWo/citotrofoblasto apresentaram maior índice de infecção (Fig. 2A) e número total de parasitos (Fig. 2B) do que células BeWo/sincitiotrofoblasto ($P < 0,05$). As fotomicrografias representativas ilustram a proporção de parasitos em cada linhagem celular. Sendo que nas células BeWo/sincitiotrofoblasto (Fig. 2C) houve uma resistência à infecção comparado à linhagem de HTR-8/trofoblasto extraviloso (Fig. 2D) e BeWo/citotrofoblasto (Fig. 2E).

5.3 Células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram menor produção de IL-6

Para verificar possíveis mecanismos imunológicos associados à susceptibilidade diferencial à infecção por *T. gondii* entre as três populações celulares, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram mensuradas no sobrenadante da cultura celular armazenado através da técnica de ELISA.

Independentemente da infecção, as células HTR8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram uma secreção reduzida de IL-6 em comparação com as células BeWo (citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto) ($P < 0,05$), enquanto que a produção de IL-6 foi similar entre citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto na ausência ou presença de *T. gondii* (Fig. 3). Após a infecção, a produção de IL-6 apresentou uma expressão maior em todos os tipos de células quando comparados aos respectivos controles ($P < 0,05$) (Fig. 3).

Os dados sobre a expressão de MIF, TGF- β 1, IL-12p70, TNF- α , IL-10 e IFN- γ não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as populações celulares ou permaneceram abaixo do limite de detecção (dados não apresentados).

5.4. As células HTR-8 / SVneo (trofoblasto extraviloso) ativaram maior fosforilação de ERK1/2, especialmente quando infectadas por *T. gondii*

A fim de investigar os mecanismos intracelulares desencadeados por *T. gondii* nas três populações trofoblásticas, a fosforilação das MAPKs foi avaliada nas três linhagens celulares, infectadas ou não pelo parasita, já que nossos estudos anteriores demonstraram envolvimento de ERK1/2 na susceptibilidade de células BeWo para *T. gondii* (BARBOSA et al., 2014).

As células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram maior fosforilação ERK1/2 em comparação com as células BeWo (citotrofoblasto e sinciotrofoblasto), independentemente da infecção por *T. gondii* ($P < 0,05$, Fig. 4A, B). Quando as células HTR-8/SVneo não infectadas e infectadas foram comparadas, a fosforilação ERK1/2 aumentou significativamente em células infectadas ($P < 0,05$, Fig. 4A, B), enquanto que não foram detectadas alterações em ambos citotrofoblasto e sinciotrofoblasto (Fig. 4A, B). As fosforilação das MAPKs p38 e c-Jun não foram detectados em nenhuma condição experimental (dados não mostrados).

5.5. A inibição de ERK1/2 induz a redução da infecção por *T. gondii* nas três populações trofoblásticas

Para verificarmos o envolvimento da via de sinalização de ERK1/2 na infecção por *T. gondii*, o índice de infecção e o número total de parasitos foram analisados em células tratadas com inibidor ERK1/2 (PD98059). Após o tratamento, detectamos uma redução significativa tanto no índice de infecção quanto no número total de parasitas, independentemente do tipo de célula ($P < 0,05$, Fig. 5A, B), com exceção do índice de infecção em células de sincitiotrofoblasto (Fig. 5A, B). O *Western Blotting* foi realizado em todos os tipos de células na presença de PD98059 para verificar se esse inibidor foi realmente capaz de reduzir significativamente a fosforilação ERK1/2. Nossos dados mostraram uma redução significativa da fosforilação ERK1/2 em todas as populações de trofoblastos tratadas com PD98059, conforme demonstrado na Fig. 5C.

Após a inibição, avaliamos a expressão da citocina IL-6, a qual foi realizada com os sobrenadantes da cultura de células dos três tipos de linhagens, infectadas com *T. gondii*. Como esperado, as células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso), quando não tratadas com PD98059, produziram níveis mais baixos de IL-6 em comparação com as células BeWo (citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto) ($P < 0,05$, Fig. 5D). Na presença do inibidor de PD98059, houve aumento da produção de IL-6 em células BeWo/sincitiotrofoblasto quando comparado às células não tratadas, enquanto a liberação de IL-6 foi regulada positivamente em células HTR-8/SVneo tratadas com PD98059 em relação ao controle respectivo ($P < 0,05$, Fig. 5D).

6. DISCUSSÃO

As células trofoblásticas são componentes importantes na manutenção de uma gestação de sucesso, além de exercerem papel fundamental na resistência materna à infecção e transmissão vertical de agentes patogênicos, pois esses tipos celulares constituem a barreira na interface materno-fetal (BOYD et al., 1970; HUNTER et al., 2012). As linhagens celulares representativas dessas células no modelo *in vitro* são extremamente importantes para avaliar o que ocorre ao longo do processo de placentação e invasão de células trofoblásticas na interface materno-fetal, bem como o papel do trofoblasto durante uma infecção por *T. gondii*. Essas células, *in vitro*, apresentam a capacidade de simular as funções das células do microambiente materno e assim podemos realizar estudos para facilitar a compreensão dos aspectos relacionados ao parasito-hospedeiro (BOYD et al., 1970; HUNTER et al., 2012).

Inicialmente, no presente estudo, obtivemos as células de sinciciotrofoblasto das células progenitoras BeWo (citotrofoblasto), uma vez que estas células têm a capacidade de se diferenciar em sinciciotrofoblasto pelo tratamento com Forskolin e PMA. Forskolin induz a fusão celular, pois aumenta os níveis intracelulares de cAMP, que modula a expressão de fosfatidilserina, transporte de glicose e ativação de canais de Ca^{+} e K^{+} na membrana celular. Após esse processo, as células aumentam a capacidade de fusão e se tornam multinucleadas, transformando-se em sinciciotrofoblasto (ISHIKAWA et al., 2014; HUNTER et al., 2012; OMATA et al., 2013; RIDELL et al., 2013). Estas células podem ser caracterizadas pela sua morfologia, uma vez que são células multinucleadas e visivelmente maiores do que as células de citotrofoblasto. Portanto, a avaliação da estrutura em relação ao diâmetro e área celular são métodos significativamente viáveis (OMATA et al., 2013; PATTILLO

et al., 1968). Neste sentido, utilizamos células BeWo/citotrofoblasto tratadas como progenitores para as células BeWo/sinciciotrofoblasto.

Após obtenção das três populações trofoblásticas, comparamos a susceptibilidade dessas células à infecção por *T. gondii*. As células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) apresentaram maior índice de infecção e número total de parasitas em comparação com ambas as células BeWo, demonstrando que *T. gondii* apresentou capacidade mais eficaz de invadir e proliferar em células de trofoblasto extraviloso humano. Além disso, as células BeWo/citotrofoblasto demonstraram maior susceptibilidade a *T. gondii* quando comparadas às células BeWo/sinciciotrofoblasto. Portanto, a partir dos três tipos de células, as células de sinciciotrofoblasto foram a população mais resistente à infecção por *T. gondii*, enquanto as células do trofoblasto extraviloso as mais susceptíveis a infecção.

Alguns estudos demonstraram que diferentes linhagens celulares apresentam diversas susceptibilidades a patógenos por mecanismos distintos. Um estudo anterior mostrou que as células BeWo e HeLa (células epiteliais humanas do útero) são susceptíveis à infecção por *Neospora caninum*, um parasita intimamente relacionado a *T. gondii*, embora as células HeLa apresentem uma susceptibilidade maior a este parasita quando comparadas às células BeWo (CARVALHO et al., 2010). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que IL-10 ou TGF- β 1 induziram um aumento considerável tanto na replicação intracelular de *T. gondii* quanto no índice de infecção nas células BeWo e HeLa. No entanto, o IFN- γ foi capaz de controlar a infecção apenas em células HeLa, demonstrando que diferentes populações de células apresentam susceptibilidade diferencial de acordo com o perfil de citocina que é produzido (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2015). De acordo com nossas pesquisas, as células de sinciciotrofoblasto foi o tipo celular mais resistente à infecção

por *T. gondii*. Um estudo anterior demonstrou diferenças na susceptibilidade a *T. gondii* em explantes de vilos humanos, onde 80% dos vacúolos parasitóforos foram encontrados em trofoblasto extraviloso, enquanto cerca de 5% foram detectados em células de sinciciotrofoblasto (ROBBINS et al., 2012). De acordo com os autores, esses dados foram uma surpresa, uma vez que as células de trofoblasto extraviloso ocupam apenas 5% da área superficial desses explantes vilosos, mas a presença de taquizoítas de *T. gondii* em células de sinciciotrofoblasto foi rara e poucos parasitas se replicaram nessas células (ROBBINS et al., 2012).

Outro estudo recentemente publicado demonstrou a resistência do sinciciotrofoblasto à infecção por *T. gondii*. Ander e colaboradores (2018) utilizaram células primárias de trofoblasto humano, isoladas de placentas a termo, e explantes de vilosidades coriônicas de segundo trimestre gestacional para determinar os mecanismos desencadeados pelo trofoblasto humano contra a infecção por *T. gondii*. Eles mostraram que os sinciciotrofoblasto placentário restringe a infecção em estágios distintos do ciclo lítico do parasita no momento da ligação e durante a replicação intracelular (ANDER et al., 2018).

Esta baixa susceptibilidade à infecção parasitária em células de sinciciotrofoblasto pode ser explicada pela sua morfologia. O sinciciotrofoblasto consiste em células multinucleadas de grande diâmetro e pode fornecer proteção e resistência ao microambiente celular (CANIGGIA et al., 1997). Esse fato pode ocorrer porque ele é altamente polarizado e coberto com microvilosidades densas em toda a superfície apical, o que proporciona uma grande área superficial para troca de gases, nutrientes e liberação de resíduos e outros fatores como produção de citocinas e vias de sinalização associadas a estas células (CANIGGIA et al., 1997). Da mesma forma, a alta susceptibilidade a *T. gondii* em células de trofoblasto extraviloso pode ser devido ao

fato de que essas células adquirem um fenótipo invasivo para infiltrar-se profundamente na região de decídua e então alcançar e penetrar nos vasos deciduais (Ko et al., 2016).

O papel das células trofoblásticas na manutenção de um microambiente favorável para a interface materno-fetal, é caracterizado tipicamente por uma resposta imune do tipo Th2, preferencialmente (ANGELONI et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; CASTRO et al., 2013; GUIRELLI et al., 2015; HUNTER et al., al., 2012), e está associada à prevenção da rejeição ao feto. No entanto, as citocinas antiinflamatórias produzidas por células trofoblásticas ou por algumas outras células da interface materno-fetal podem facilitar a transmissão de *T. gondii* ao embrião ou tecido fetal (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2015). Portanto, após verificar a susceptibilidade ao parasita, nosso próximo passo foi investigar o perfil de citocinas produzido pelas três populações trofoblásticas na presença ou ausência da infecção.

Observamos um aumento expressivo na liberação de IL-6 em células de sinciciotrofoblasto, enquanto que a produção de IL-6 em células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) foi expressa de forma bem reduzida. Esses perfis de citocinas podem explicar porque as células de sinciciotrofoblasto eram mais resistentes e as células HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso) eram mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*. A IL-6 é uma citocina pró inflamatória envolvida no controle de proliferação de *T. gondii* em muitos tipos de células, incluindo células de trofoblasto humano e monócitos (BARBOSA et al., 2015; CASTRO et al., 2013). Além disso, alguns estudos mostraram que a IL-6 é um regulador chave para a eficácia terapêutica contra a infecção por *Leishmania donovani* (BENGS et al., 2005). IL-6 é essencial para o processo de implantação do embrião e nos estágios iniciais da gestação, assim sendo, a IL-6 é uma citocina de extrema importância na interface materno-fetal para garantir o sucesso gestacional e, ao mesmo tempo para prevenir ou controlar a infecção por *T. gondii* em

trofoblasto humano. Portanto, podemos especular que as células de sinciciotrofoblasto representam uma barreira imunológica, além de uma barreira física aos agentes patogênicos. Além disso, estudos anteriores sugeriram que a IL-6 pode ter um papel protetor durante a infecção por *T. gondii* induzindo a formação do cisto (JEBBARI et al., 1998).

Depois de analisarmos a produção de citocinas nas três linhagens celulares, investigamos a expressão das vias de sinalização relacionadas as MAPKs que poderiam estar envolvidas na susceptibilidade diferencial à infecção por *T. gondii* encontrada nessas células. A ERK1/2 fosforilada foi a única que apresentou alguma expressão a ser avaliada. Um estudo mostrou que a via ERK1/2 favorece a proliferação intracelular de *T. gondii* e pode participar da regulação do ciclo de vida assexual do parasita, garantindo assim sua sobrevivência (SURACHETPONG et al., 2009). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a alta expressão da ERK1/2 fosforilada está associada à infecção por *T. gondii* em células BeWo, uma vez que o aumento da fosforilação de ERK1/2 induz a uma maior proliferação parasitária (BARBOSA et al., 2014). Nossos dados demonstraram que as células HTR-8/SVneo eram mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* e, ao mesmo tempo, apresentaram alta fosforilação de ERK1/2, enquanto as células de sinciciotrofoblasto, que apresentaram maior resistência a *T. gondii*, apresentaram uma expressão reduzida de ERK1/2. As MAPKs p38 e c-JUN fosforiladas não foram detectadas em nenhuma condição experimental. Assim sendo, os nossos resultados sugerem que as células HTR-8/SVneo são mais susceptíveis a infecção por *T. gondii*, devido aos elevados níveis de ERK1/2 e níveis baixos de IL-6.

A presença da atividade de MAPK em células infectadas com *Toxoplasma*, promovendo a sobrevivência e a proliferação de parasitas já foi demonstrada (LI et al.,

2016). No presente estudo, observamos que a inibição de ERK1/2 usando PD98059 reduziu significativamente o parasitismo nas três linhagens celulares estudadas, indicando que a via de sinalização de ERK estava associada ao aumento da proliferação de parasitas. Estudos anteriores demonstraram uma redução no parasitismo em células BeWo após a inibição da via de sinalização ERK (BARBOSA et al., 2014). Além disso, alguns estudos mostraram a importância da via de sinalização MAPK/ERK em infecção causada por outros protozoários, como *Giardia lamblia* (ELLIS et al., 2003), *Leishmania mexicana* (BENGS et al., 2005), *Plasmodium falciparum* (SURACHETPONG et al., 2009) e células monocíticas humanas infectadas por *T. gondii* (VALÈRE et al., 2003; ROBERT-GANGNEUX et al., 2012), propondo que a via de sinalização de MAPK/ERK também possa ser responsável pela transdução do sinal e é essencial para a infecção parasitária.

Além disso, houve uma mudança no perfil de IL-6 nas células de sinciciotrofoblasto após o tratamento com PD98059 (inibidor de ERK1/2). Assim, a expressão da citocina IL-6 é parcialmente dependente da via de sinalização ERK1/2, uma vez que são encontradas diferenças estatisticamente significativas quando esta via de sinalização é inibida. Por outro lado, não houve diferenças significativas na produção de outras citocinas quando o PD98059 foi utilizado (dados não apresentados), demonstrando que somente IL-6 está associada com a via de sinalização de ERK1/2. Provavelmente, outros mecanismos podem estar envolvidos na susceptibilidade diferencial a *T. gondii* nas células BeWo (sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto) e HTR-8/SVneo (trofoblasto extraviloso), e estudos futuros devem ser conduzidos para identificá-los.

7. CONCLUSÕES

O conjunto dos nossos resultados demonstra que:

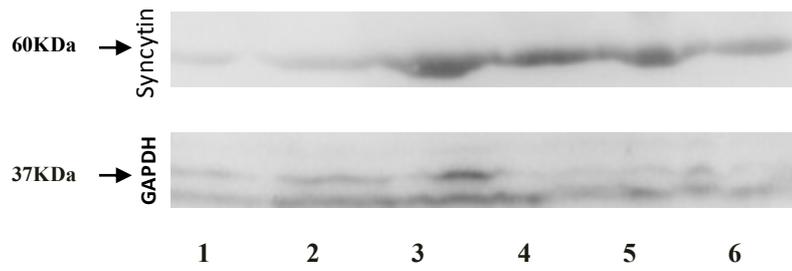
- Células trofoblásticas sincicializadas são mais resistentes à infecção por *T. gondii*;
- As células de trofoblasto extraviloso (HTR-8/SVneo) são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*;
- As células de sinciciotrofoblasto apresentaram uma secreção de IL-6 em quantidades maiores quando comparada às demais células, citocina pró inflamatória que auxilia no combate à infecção;
- HTR-8/SVneo, célula mais susceptível à infecção, apresentou níveis reduzidos de IL-6, o que pode favorecer a entrada de parasitos nesse tipo celular;
- O sinciciotrofoblasto apresentou uma expressão reduzida da via de sinalização de ERK1/2 fosforilada, enquanto células HTR8/SVneo demonstraram maior fosforilação de ERK1/2 ;
- Após inibição da via de sinalização de ERK1/2 fosforilada (PD98059), as células de trofoblasto extraviloso apresentaram um aumento na expressão da citocina IL-6, e uma redução nos índices de infecção e número totais de parasito;
- As diferenças de susceptibilidade como demonstrado aqui, podem estar associadas à ausência e presença da citocina IL-6, e a via de sinalização de ERK. Eles interferem na infecção por *T. gondii* nas diferentes linhagens celulares.

8. FIGURAS

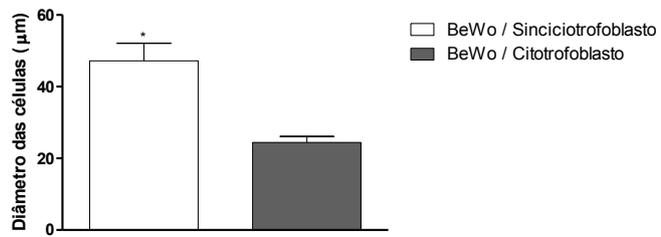
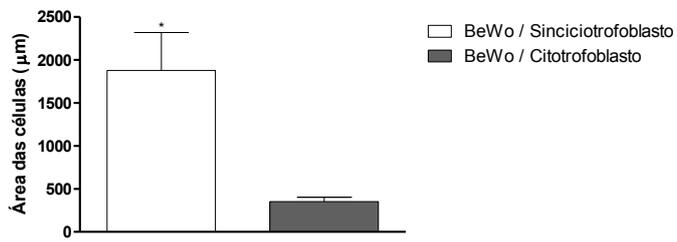
FIGURA 1

A

24h



B



C

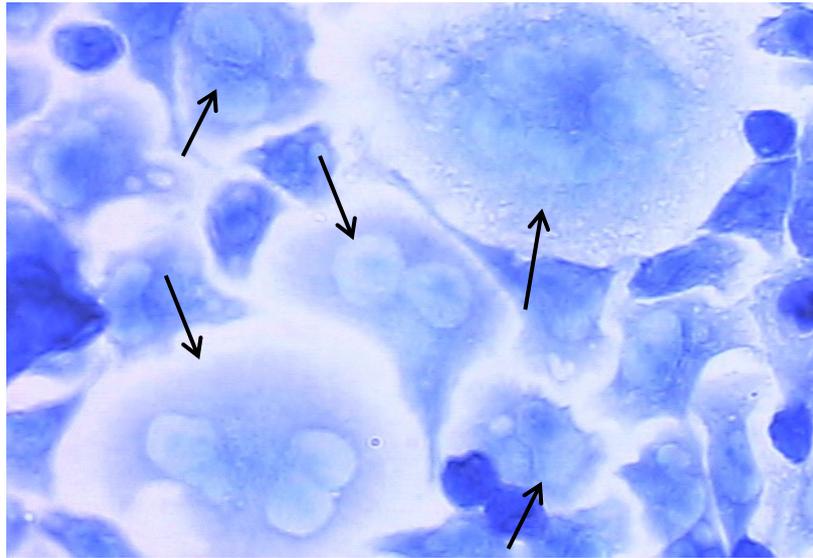
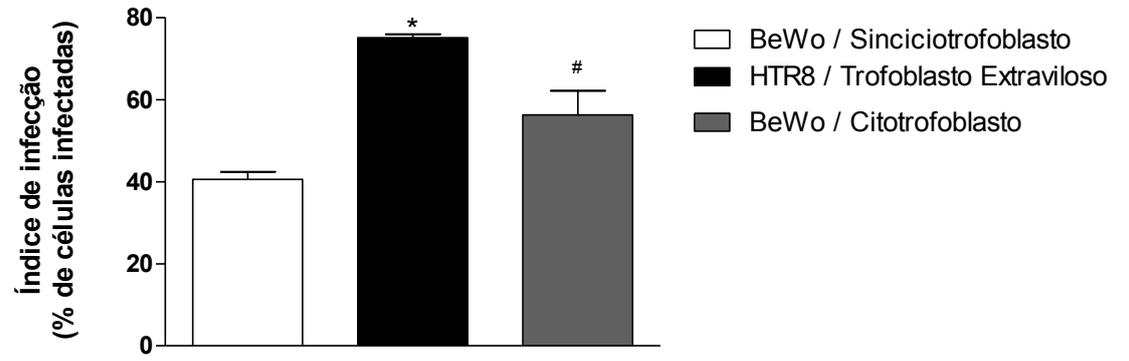


FIGURA 2

A



B

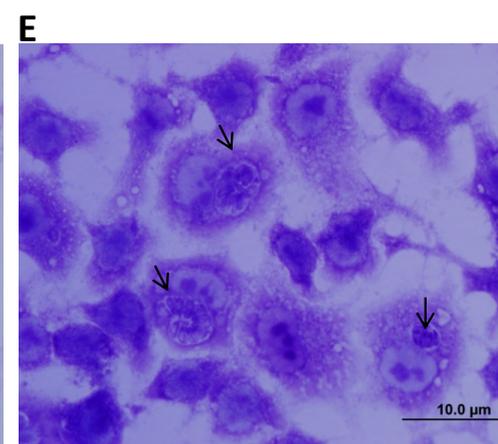
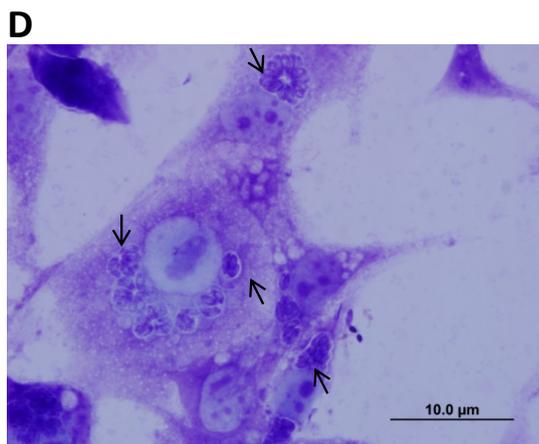
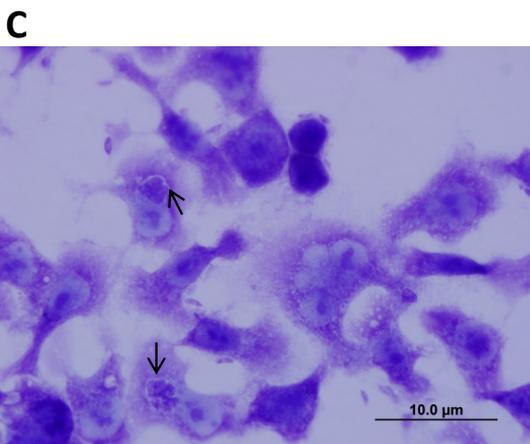
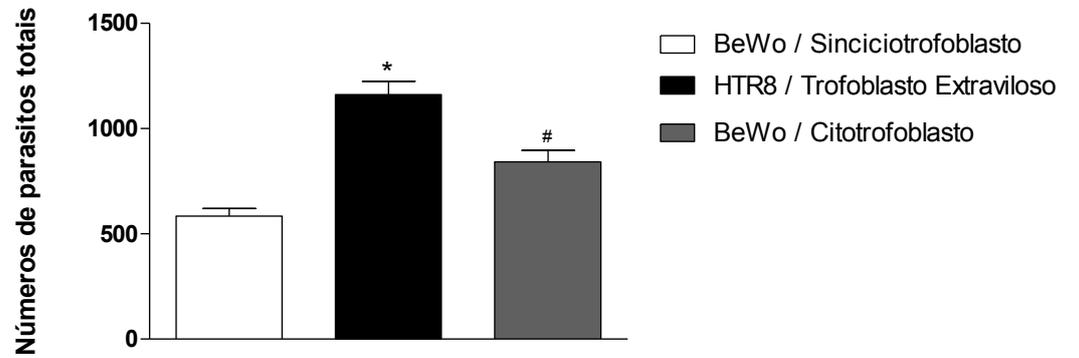


FIGURA 3

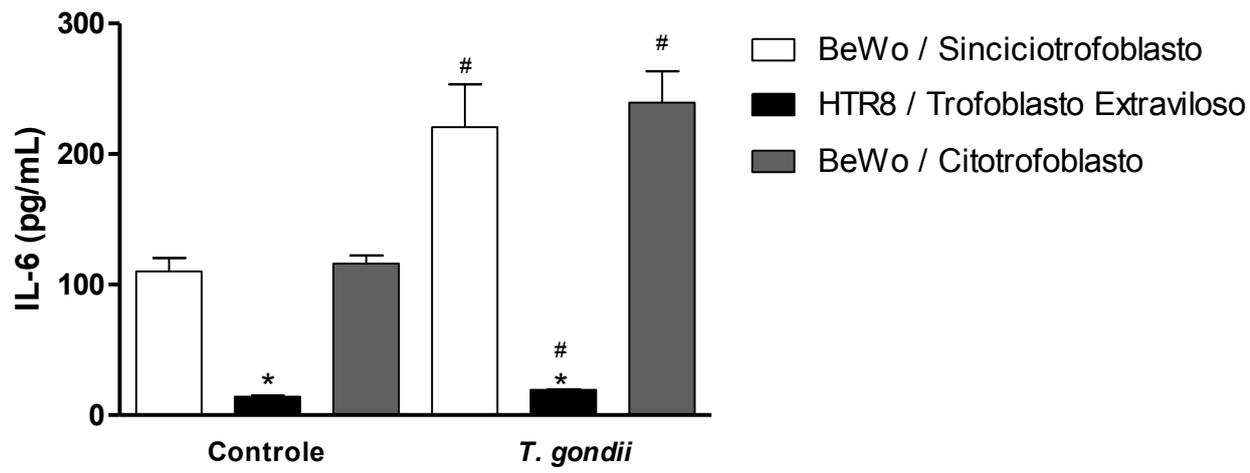
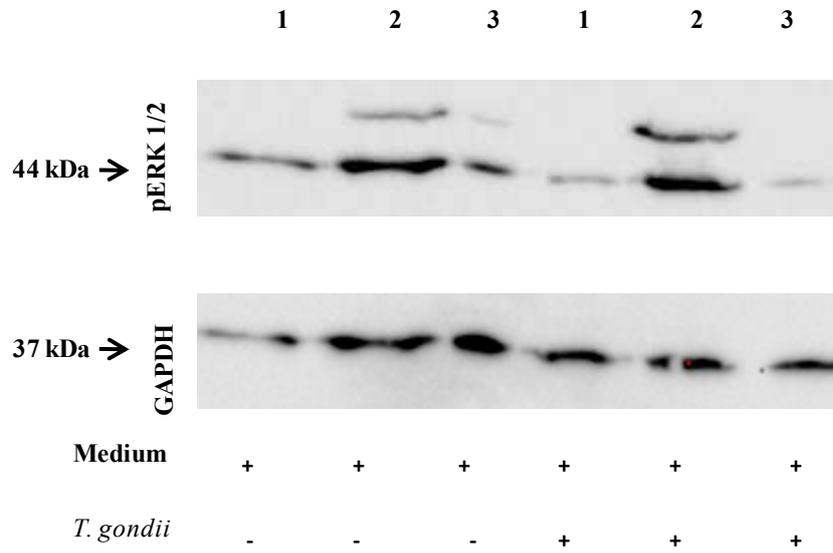


FIGURA 4

A



B

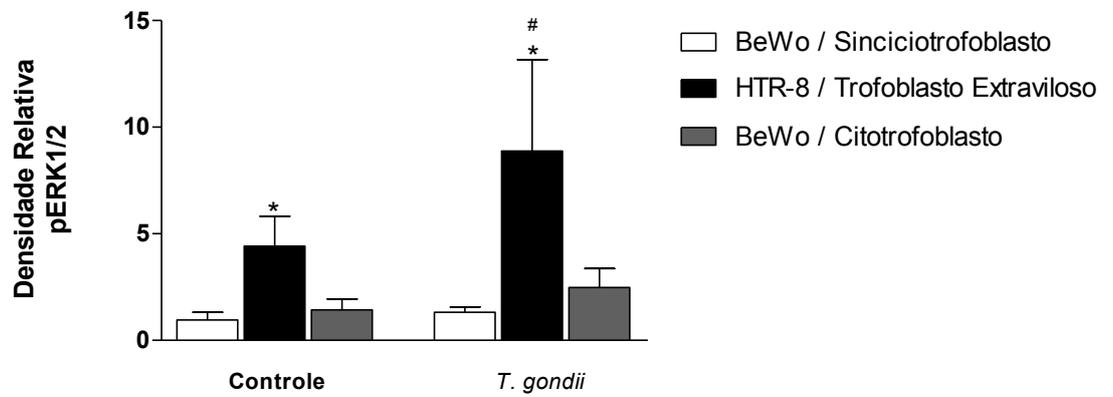
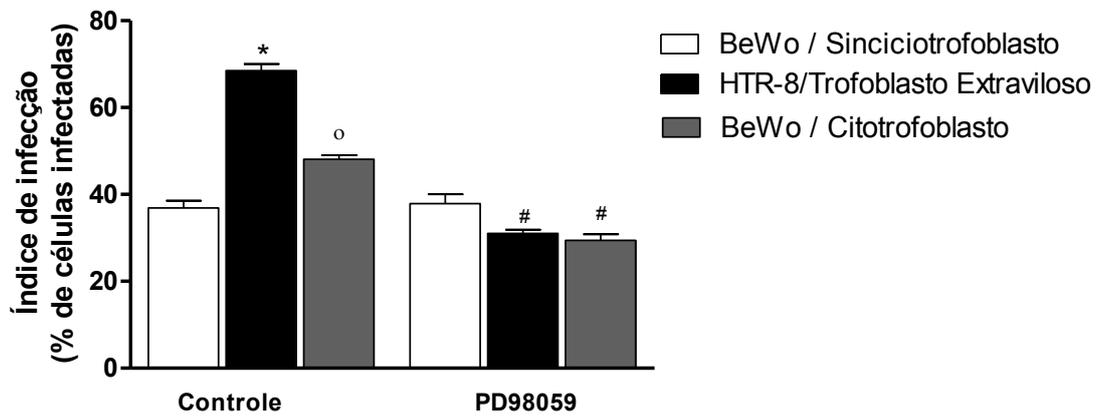
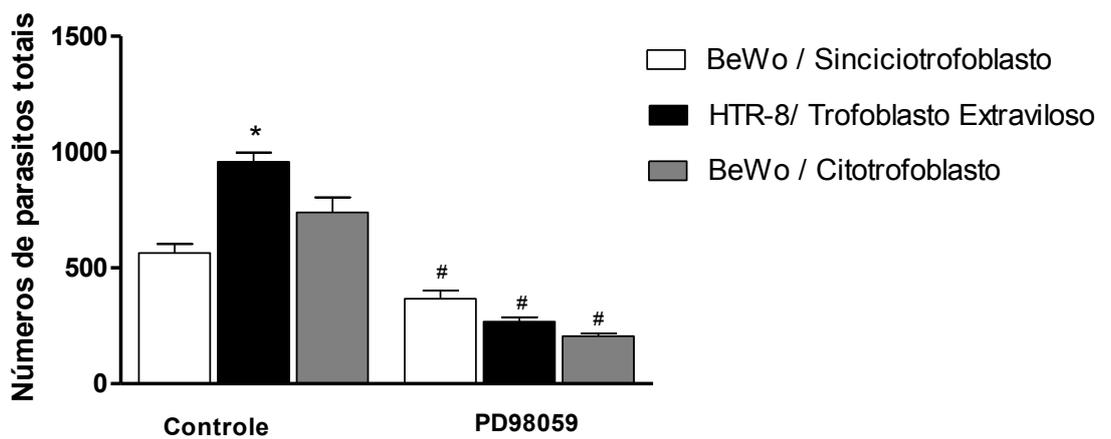


FIGURA 5

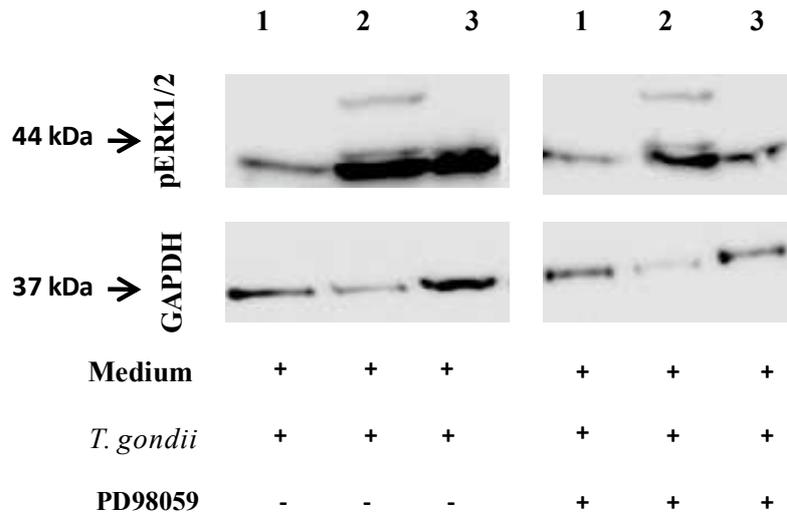
A



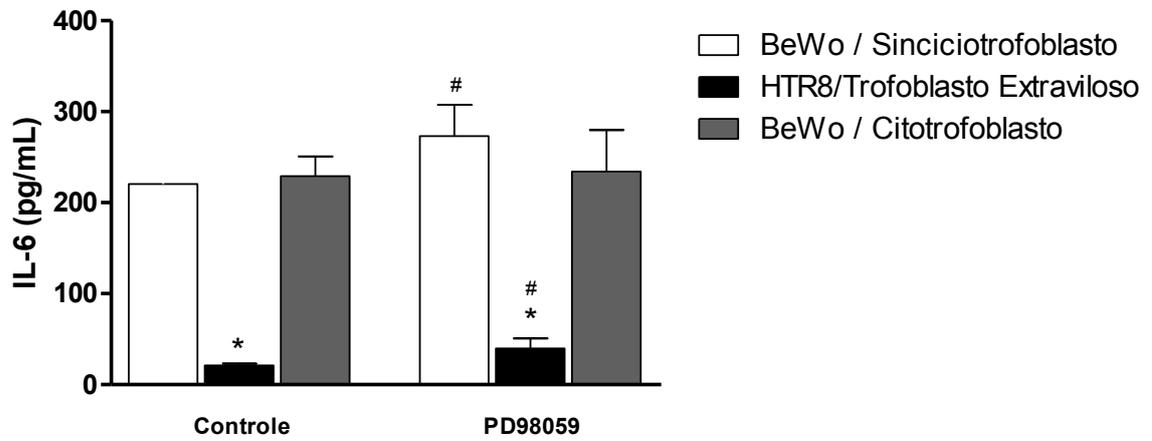
B



C



D



REFERÊNCIAS

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infection Immunology**.v. 72, p. 1397-1401, 2004.

<https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1397-1401.2004>

ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human Reproduction**, v. 12, p. 731-746, 2006.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dml004>

AJZENBERG, D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? **Future Microbiology**, v. 5, p. 841-43, 2010.

<https://doi.org/10.2217/fmb.10.55>

AKBAR, A.N., VUKMANOVIC-STEJIC, M.; TAAMS, L.S.; MACALLAN, D.C.: The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 231-37, 2007. <https://doi.org/10.1038/nri2037>

ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature Immunology**, v. 5, p. 266-271, 2004.
<https://doi.org/10.1038/ni1037>

ALVES, J.A.B.; OLIVEIRA, L.A.R.; OLIVEIRA, M.F.; ARAÚJO, R.M.; SANTOS, R.C.S.; INAGAKI, A.D.M. Prevalência de anticorpos anti-toxoplasmagondii em mulheres grávidas. **Revista de Enfermagem**. v.17, p. 107-110, 2009.

ANDER, S. E.; RUDZKI, E.N.; ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B.; BOYLE, J.P. Human placental syncytiotrophoblasts restrict *Toxoplasma gondii* vertical transmission at two distinct stages and induce CCL22 in response to infection. **BioRXIV**, 2018.
<https://doi.org/10.1101/170944>

ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; CASTRO, A.S.; GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Apoptosis and S Phase of the Cell Cycle in BeWo Trophoblastic and HeLa Cells are Differentially Modulated by *Toxoplasma gondii* Strain Types. **Placenta**. v.30, p. 785-791, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.07.002>

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, p. 973-82, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.09.005>

APLIN, J.D. The cell biological basis of human implantation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.**, v.14, p. 757-64, 2000. <https://doi.org/10.1053/beog.2000.0116>

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, p. 299-330, 1999. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1299>

AJZENBERG, D.; COGNE, N.; BESSIERES, M.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDE, M. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **Journal of Infection Disease**. v.186, p.684-9, 2002. <https://doi.org/10.1086/342663>

BACHER, M.; MEINHARDT, A.; LAN, H.Y.; BUCALA, R. et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. **American Journal of Pathology**, United States, v.150, p. 235-46, 1997.

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**. p. 536-545, 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.O.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.P.; FERRO, E.A.V. 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, p.152-162, 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, p.82, 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **Journal of Experimental Medicine**. p.1625-1633, 2002. <https://doi.org/10.1084/jem.20020258>

BASTOS, L.M.; MACEDO, A.G.Jr.; SILVA, M.V.; SANTIAGO, F.M.; RAMOS, E.L.P.; SANTOS, F.A.A.; PIROVANI, C.P.; GOULART, L.R.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes from GRA2 protein are able to enhance mice survival in a model of experimental toxoplasmosis. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00059>

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. Pathology of the human placenta. v. 5, 2006.

BENGS, F.; SCHOLZ, A.; KUHN, D.; WIESE, M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. **Molecular Microbiology**. v.55, p. 1606-1615, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04498.x>

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; MITCHELL, R.A.; MARTIN, S.B.; TRACEY, K.J.; VOELTER, W.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**. p. 756-759, 1993. <https://doi.org/10.1038/365756a0>

BESSA, T.F.; CORDEIRO, C.A.; GONÇALVES, R.M.; YOUNG, L.H.; CAMPOS, W.R.; ORÉFICE, F.; TEIXEIRA, A.L. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor-2 (sTNFR2) in patients with active toxoplásmica retinochoroiditis. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. v.16, p. 540-544, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.07.009>

BLADER, I.J.; SAEIJ, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion and virulence. **APMIS**, v.117, p.458-476, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BLADER. I.J.; COLEMAN, B.I.; CHEN, C.T.; GUBBELS, M.J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annals of Reviste Microbiology**, v.69, p.463-485, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BOIA, M.N.; CARVALHO-COSTA, F.A.; SODRÉ, F.C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**; v. 50, p. 17-20, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000100004>

BOZZA, M.; SATOSKAR, A.R.; LIN, G.; LU, B.; HUMBLE, A.A.; GERARD, C.; DAVID, J.R. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 189, p.341-346, 1999. <https://doi.org/10.1084/jem.189.2.341>

BUCALA, R. Neuroimmunomodulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Annals of New York Academy of Science**. p. 74-82, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09551.x>

BUZONI-GATEL, D.; KASPER, L.H. Innate Immunity in *Toxoplasma gondii* Infection. In: WEISS, L. M.; KIM, K. **Toxoplasma gondii**. p. 593-607, 2007. <https://doi.org/10.1038/nri3598>

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; SPIEGEL, L.A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. **Nature**. v. 377. p. 68-71, 1995. <https://doi.org/10.1038/377068a0>

CANIGGIA, L.; LYE, S.J.; CROSS, J.C. Activin is a local regulatory of human cytotrophoblast cell differentiation. **Endocrinology**. v.138, p. 3976-3986, 1997. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5403>

CARELLOS, E. V. M.; CAIAFFA, W. T.; ANDRADE, G. M. Q.; ABREU, M. N. S.; JANUÁRIO, J. N. Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease? **Epidemiology Infectious**, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001507>

- CARGNELLO, M.; ROUX, P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and molecular biology reviews**, p. 50-83, 2011. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica.**, v. 81, p.111-122, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00201-7)
- CARRUTHERS, V.B.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion Microbiology**. v.10, p. 83-89, Feb., 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>
- 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, p. 240-7, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.006>
- CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J.S.; MADI, K.; FEIJÓ, D.F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; SOUZA, H.S.; BOZZA, M.T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PlosOne**, v.6, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025259>
- CHAUDHRY, S. A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Canadian Family Physician.**, v. 60, p. 334-6, 2014.
- CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D., HORNOY, P.; DUPOUY, D.; LEROUX, B., BORU, J.P.; PINON, J.M. Preconception seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.9, p. 489-490, 2002. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.2.489-490.2002>
- CHEN, Z.; GIBSON, T.B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M.H. MAP kinases. **Chemical Reviews**. v. 101, p. 2449–2476, 2001. <https://doi.org/10.1021/cr000241p>
- CHEN, K.T.; ESKILD, A.; BRESNAHAN, M.; STRAY-PEDERSEN, B.; SHER, A.; JENUM, P.A. Previous maternal infection with *Toxoplasma gondii* and the risk of fetal death. **American Journal of Obstetrics And Gynecology**, v. 193, p. 443-449, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.12.016>
- CHENG, C. J.; CHANG, H.M.; LEUNG, P.C.K. TGF- β 1 inhibits trophoblast cell invasion by inducing Snail-mediated down-regulation of VE-cadherin. **The Journal of Biological Chemistry**. 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.488866>
- COMBE, C.L.; CURIEL, T.J.; MORETTO, M.M.; KHAN, I.A. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. **Infection and Immunity**. v.73, p. 4913– 4921, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4913-4921.2005>
- CORREA, W. M.; CORREA, C.N. M. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. **Medsi**. p. 757-766, 1992.

COSTA, M.A.; FONSECA, B.M.; MENDES, A.; BRAGA, J.; TEIXEIRA, N.A.; CORREIA-DA-SILVA, G. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol dysregulates the synthesis of proteins by the human syncytiotrophoblast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1861, p. 205-212, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.12.008>

CROCKER, I.P.; COOPER, S.; ONG, S.C.; BAKER, P.N. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblast and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction, **American Journal of Pathology**. v.162, p. 637-643, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63857-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63857-6)

DAOUD, G.; AMYOT, M.; RASSART, E.; MASSE, A.; SIMONEAU, L.; LAFOND, J. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. **Journal Physiology**. v. 2, p. 409-423, 2005. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089326>

DAUN, J.M.; CANNON, J.G. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 279, p.1043-1049, 2000. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.3.R1043>

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

DESAI TR, LEEPER NJ, HYNES KL, GEWERTZ BL. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. **Journal of Surgical Research**. v.104, 2002. <https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6415>

DIEZ-RUIZ, A.; TILTZ, G.P.; ZANGERLE, R. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. **European Journal Haematology**. p.1-8, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1995.tb01618.x>

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, p. 267-99, 1998.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p. 57-72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>

DUPONT, C.D.; CHRISTIAN, D.A.; HUNTER, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**. v. 34, p.793-813, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

EATON, B.; CONTRACTOR, S. In vitro assessment of trophoblast receptors and placental transport mechanisms. **Blackwell Scientific Publication**, p. 471-503, 1993.

ELLIS, J.G.; DAVILA, M.; CHAKRABARTI, R. Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Stage-specific activation and intracellular localization. **Journal Biology Chemistry**. v. 278, p.1936-1945, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209274200>

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

FEREIG, R.M.; NISHIKAWA, Y. Peroxiredoxin 3 promotes IL-12 production from macrophages and partially protects mice against infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**. v. 65, p. 741-8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.09.008>

FERGURSON, D.J.P.; BOWKER, C.; JEFFERY, K.J.M.; CHAMBERLAIN, P.; SQUIER, W. Congenital Toxoplasmosis: Continued Parasite Proliferation in the Fetal Brain Despite Maternal Immunological Control in Other Tissues. **Clinical Infectious Disease.**, v.56, p.204-208, 2013. <https://doi.org/10.1093/cid/cis882>

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

FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R.; LETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D.A.O.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.R. Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Up-Regulated in Human First-Trimester Placenta Stimulated by Soluble Antigen of *Toxoplasma gondii*, Resulting in Increased Monocyte Adhesion on Villous Explants. **The American Journal of Pathology.**, v. 172, 2008. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070432>

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

FUGLEWICZ A.J.; PIOTROWSKI, P.; STODOLAK, A.; Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review. **Advances in clinical and Experimental Medicine**, v.26, p. 1031-1036, 2016.

FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.O.; COSTA, I.N.; GOMES, A.O.; SILVA, A.L.N.; PENA, J.D.O.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. **Placenta.**, v.32, p.116-120, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.012>

FRANCO, P.S.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; LETTA, F.; SHWAB, E.K.; SU, C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers Microbiology**. v. 6, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00181>

FRENKEL, J. K. Adoptive immunity to intracellular infection. **Journal of Immunology**. p.1309 - 1319, 1967.

FROLIK, C.A.; DART, L.L.; MEYERS, C.A.; SMITH, D.M.; SPORN, M.B. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. p. 3676-80, 1983. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3676>

GOEDERT, M.; CUENDA, A.; CRAXTONM, J. R.; COHEN, P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. **The Embo Journal**. v. 16, p. 3563–3571, 1997. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3563>

GOLDSZMID, R.S.; CASPAR, P.; RIVOLLIER, A.; WHITE, S.; DZUTSEV, A.; HIENY, S.; KELSALL, B.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. **Immunity**. v. 36, p.1047–1059, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.026>

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B.; FERMINO, M.L.; FERRO, E.A.M. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. **Immunopathology and Infectious Diseases.**, v.178, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>

EHRHARDT, J.; BREDOW, M.; PICCENINI, S.; ZYGMUNT, M.; GOYAL, P.; BRÜNNERT, D.; EHRHARDT, J.; BREDOW, M.; PICCENINI, S.; ZYGMUNT, M. Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-phosphate receptor 2 involving Rho/Rho-kinase and Rac1 signaling pathways. **Molecular Human Reproduction**. V. 19, p.528-38, 2013. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat023>

GOV, L.; KARIMZADEH, A.; UENO, N.; LODOEN, M. B. Human Innate Immunity to *Toxoplasma gondii* Is Mediated by Host Caspase-1 and ASC and Parasite GRA15. **Mbio**. v. 4, 2013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00255-13>

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, p. 204-211, 1993. <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1139>

GUBBELS, M.J.; DURAISINGH, M.T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **International Journal for Parasitology**. v. 42, p. 1071-81, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.009>

HAN, J.; LEE, J.D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 265, p.808-811, 1994. <https://doi.org/10.1126/science.7914033>

HANNA, N.; HANNA, I.; HLEB, M. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **Journal of Immunology**. v.164, p.5721-8, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5721>

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlations of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**. v.172, p.1561-6, 1995. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

HUGHES HPA. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitology Today**, v. 4, p. 340–7, 1988. [DOI:10.1016/0169-4758\(88\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90003-8)

HUNTER, C.A.; SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, p. 766-78, 2012. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90003-8)

IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Starvation of low-density lipoprotein-derived cholesterol induces bradyzoite conversion in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Vectors.**, v. 7, p. 248, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-248>

INGRAM, W.M.; GOODRICH, L.M.; ROBEY, E.A.; EISEN, M.B. Mice Infected with Low-Virulence Strains of *Toxoplasma gondii* Lose Their Innate Aversion to Cat Urine, Even after Extensive Parasite Clearance. **Plos One**, v.8, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075246>

INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 1-7, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x>

JEBBARI, H.; ROBERTS, C.W.; FERGUSON, D.J.P.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**. v.20, p. 231-239, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x>

JIANG, Y.; CHEN, C.; LI, Z.; GEGNER, J.A.; LIN, S.; HAN, J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p.17920-17926, 1996. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17920>

JIMENEZ-RUIZ, E. ; DAHER, W.; MEISSNER, M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Molecular Biochemistry Parasitology**. v. 209, p. 18-25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.007>

JOACHIM, R.; ZENCLUSSEN, A.C.; POLGAR, B.; DOUGLAS, A.J.; FEST, S.; KNACKSTEDT, M.; KLAPP, B.F.; ARCK, P.C. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. **Steroids**, v. 68, p. 931-940, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.08.010>

JOHN, B.; WENINGER. W.; HUNTER, C.A. Advances in imaging the innate and adaptive immune response to *Toxoplasma gondii*. **Future Microbiology**, v. 5,p.1321-8, 2010. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.97>

JONES, R. L., STOIKOS, C., FINDLAY, J.K., SALAMONSEN, L.A. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction.**, v. 132, p. 217-32, 2006. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01076>

JONGERT, E.; LEMIERE, A.; VAN GINDERACHTER, J.; DE CRAEYE, S.; HUYGEN, K.; D'SOUZA, S. Functional characterization of in vivo effector CD4+ and CD8+ T cell responses in acute Toxoplasmosis: an interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells. **Vaccine**, v. 28, p. 2556-64, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.031>

KIM, K.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexa. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 423-32, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>

KO, H.S.; PARK, B.J.; CHOI, S.K.; KANG, H.K.; KIM, A.; KIM, H.S.; PARK, I.Y.; SHIM, J.C. STAT3 and ERK signaling pathways are implicated in the invasion activity by oncostatin M through induction of matrix metalloproteinases 2 and 9. **Yonsei Medical Journal**. v.57, p.761-768, 2016. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.3.761>

KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **Journal Français D'Ophthalmologie**. v. 33, p. 362-67, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2010.03.002>

KOHLER, P.O., BRIDSON, W.E. "Isolation of hormone- producing clonal lines of human choriocarcinoma," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 32, p. 683-687, 1971. <https://doi.org/10.1210/jcem-32-5-683>

KOO, T.B.; HAN, M.; TADASHI, Y.; SEONG, W.J.; CHOI, J. Differential expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells and trophoblast giant cells at the fetomaternal interface. **Reports BMB.**, v.46, p. 507-512, 2013. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.10.223>

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V.B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Science.**, v.65, p.1900-1915, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>

LANG, C.; BROB, U.; CARSTEN, G.; LUDER, K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**. v. 100, p. 191-203, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0306-9>

LANGBEIN, M.; STRICK, R.; STRISSEL, P.L.; VOGT, N.; PARSCH, H.; BECKMANN, M.W.; SCHILD, R.L. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. **Molecular Reproduction**, v.75, p. 175–183, 2008. <https://doi.org/10.1002/mrd.20729>

LANGONI, H. Doenças ocupacionais em avicultura. **Saúde aviária e doenças**. p. 52-60, 2006.

LECHNER, C.; ZAHALKA, M.A.; GIOT, J.F.; MOLLER, N.P.; ULLRICH, A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, p.435-4359, 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4355>

LI, Z.Y.; WANG, Z.D.; HUANG, S.Y.; ZHU, X.Q.; LIU, Q. TgERK7 is involved in the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*, **Parasitology Research**. v.115, 3419-24, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5103-5>

LIM, K. H., ZHOU, Y., JANATPOUR, M., MCMASTER, M., BASS, K., CHUN, S. H., FISHER, S. J. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. **American Journal of Pathology**. n.151, p. 1809-1818, 1997.

LUN, Z.R.; LAI D.H.; WEN, Y.Z.; ZHENG, L.L.; SHEN, J.L.; YANG, T.B.; ZHOU, W.L.; QU, L.H.; HIDE, G.; AYALA, F.J. Cancer in the parasitic protozoans *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 112, p. 8835-42, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502599112>

LYSIAK, J. J., HUNT, J., PRINGLE, J.A., LALA, P.K. Localization of transforming growth factor β and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation. **Placenta**, v. 16, p.221–231,1995. [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(95\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0143-4004(95)90110-8)

MARTINEZ, P.A.; PETERSEN, C.A. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. **Immunology Research**, v. 59, p. 153-165, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8535-y>

MATUSCHEWSKI, K.; SCHÜLER, H. Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. **Subcell Biochemistry**, v.47, p. 110-20, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_9

MELO, M.B.; JENSEN, K.D.; SAEIJ, J.P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitology**. v. 27, p. 487-95, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001>

MILLER, R.K.; GENBACEV, O.; TURNER, M.A.; APLIN, J.D.; CANIGGIA, I.; HUPPERTZ, B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. **Placenta**, v.26, p. 439-448, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.002>

MONTANO, P. Y. et al. Contato com gatos:um fator de risco para a toxoplasmose congênita? **Clínica Veterinária**, v. 86, p. 78-84, 2010.

MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical of Infection Disease**. v. 47, p. 554-56, 2008. <https://doi.org/10.1086/590149>

MOSMANN, T.R., SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**., v.17, p.138–146, 1996. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(96\)80606-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)80606-2)

NAGAMATSU, T., SCHUST, D.J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. **Reproductive Science**. v.17, p.209–218, 2010. <https://doi.org/10.1177/1933719109349962>

NASIRY, S. A., SPITZ, B., HANSENS, M., LUYTEN, C., PIJNENBORG, R., Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**. v.21, n.1, pp. 193–201, 2006. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei272>

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 2003. Capítulo 25. pág. 177, 188

NGUYEN, T.D.; BIGAIGNON, G.; MARKINE-GORAYNOFF, D.; HEREMANS, H.; NGUYEN, T. N.; WARNIER, G.; DELMEE, M.; WARNY, M.; WOLF, S. F.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, .; COUTELIER, J.P. Virulent *Toxoplasma gondii* strain

RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. Pt 10, p. 869–76, 2003. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.04860-0>

OGREN, L. TALAMENTES, F. The placenta as an endocrine organ: polypeptides. **Raven Press**; p. 875- 945, 1994. [https://doi.org/10.1016/S1096-6374\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S1096-6374(03)00053-4)

OLIVEIRA, J.G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.D.; 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, p.691–8, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.06.006>

OMATA, W.; ACKERMAN, W.E.; VANDRE, D.D.; ROBINSON, J.M. Trophoblast cell fusion and differentiation are mediated by both the protein kinase C and A pathways. **PlosOne**. v.8, p.11, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081003>

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, p.1385–1394, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrinology Rev.** v. 22, p.153–183, 2001. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>

PENG, H.J.; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **Journal of Parasitology**. v. 97, p. 620-8, 2011. <https://doi.org/10.1645/GE-2712.1>

PIDOUX, G.; GERBAUD, P. COCQUEBERT, M.; SEGOND, N.; BADET, J.; FOURNIER, T.; GUIBOURDENCHE, J.; EVAÏN-BRION, D. Review: Human trophoblast fusion and differentiation: Lessons from trisomy 21 placenta. **Placenta**, v. 26, p. 581-586, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.007>

PRADO, A.A.F.; ALMEIDA, G.F.; GONTIJO, L.S.; TORRES, M.L.M. Toxoplasmosis: what the health professional should know. **Enciclopédia biosfera**. Centro Científico Conhecer., v.7, 2011.

PÖTGENS, A.J.G., DREWLO, S., KOKOZIDOU, M., KAUFMANN, P. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. **Human Reproduction Update**, v.10, n.6, p.487–496, 2004. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh039>

RAGHUPATHY, R., AL-AZEMI, M., AZIZIEH, F. Intrauterine Growth Restriction: Cytokine Profiles of Trophoblast Antigen-Stimulated Maternal Lymphocytes. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/734865>

REMYINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONT, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, O.J. editors. **Infection diseases of the fetus and newborn infant**. p. 205-356, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 3^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.856, 2001.

REYES, J.L.; TERRAZAS, L.I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMEZ-GARCÍA, L.; SNIDER, H.; SATOSKAR, A.R.; RODRÍGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection Immunology**, v.74, p. 3170–3179, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.01648-05>

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, p. 418-428, 2012. <https://doi.org/10.1128/IAI.05899-11>

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

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis: prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**. v. 21, p.458-472, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.10.006>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviste** v. 25, p. 264-96, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROBERTSON SA, O'CONNELL A, RAMSEY A. The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. **Society for Reproduction Biology**. 2000. <https://doi.org/10.4135/9781446280447.n7>

ROTH, I., CORRY, D.B., LOCKSLEY, R.M., ABRAMS, J.S., LITTON, M.J., FISHER, S.J. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. **The Journal of Experimental Medicine**. p. 539-48, 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.539>

SAITO, S. Cytokine network at the feto–maternal interface. **Journal of Reproduction Immunology**. v. 47, p. 87–103, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(00\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(00)00060-7)

SAKAGUCHI S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25 + CD4 + regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**. v. 6, p. 345-352, 2005. <https://doi.org/10.1038/ni1178>

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M.K.; MORDUE, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**. v.107, p.253-260, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

SCHAFFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Animal Reproduction Science**. v.75, p. 73-94, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00222-1)

SIBLEY, L.D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Sciences.**, v.304, p. 248-253, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>

SOMMERVILLE, C., RICHARDSON, J.M., HENRIQUEZ, F.L. Biochemical and Immunological Characterization of *Toxoplasma gondii* Macrophage Migration Inhibitory Factor. *The Journal of Biological Chemistry*. v.18, p.12733-12741, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.419911>

STURGE, C.R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection Immunology** v. 82, p. 3090-7, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01722-14>

SURACHETPONG, W.; SINGH, N.; CHEUNG, K.W.; LUCKHART, S. MAPK ERK signaling regulates the TGF- β 1-dependent mosquito response to *Plasmodium falciparum*. **PlosOne**, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000366>

SPALDING, S.M., AMENDOEIRA, M.R.R., RIBEIRO, L.C., et al. Prospective study of pregnant women and babies with risk of congenital toxoplasmosis in municipal district of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 483-9, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000400009>

TEO, F.C.; ZHOU, X.W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V.B. Cysteine Protease Inhibitors Block *Toxoplasma gondii* Microneme Secretion and Cell Invasion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 679-688, Feb., 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, p. 348-358, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.009>

TENTER, A.M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.364-369, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200033>

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 6 ed. Sao Paulo: Roca, 2002.

TONIN, A. A.; DA SILVA, A.S.; THORSTENBERG, M.L.; CASTILHOS, L.G.; FRANÇA, R.T.; LEAL, D.B.R.; DUARTE, M.M.; VOGEL, F.S.V.; LA RUE, M.L.; LOPES, S.T.A. Influence of *Toxoplasma gondii* Acute Infection on Cholinesterase Activities of Wistar Rats. **Korean Journal Parasitology.**, v.51, p.421-426, 2013. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.421>

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**. v.10, p. 59-64, 2003. <https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p59>

VARGAS-VILLAVICENCIO, J.A., LÉON-NAVA, M.A., MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p.114-21, 2009. <https://doi.org/10.1159/000180266>

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K.; SIMPSON, R.; HOLFELS, E.; HOPKINS, J.; MACK, D.; METS, M. B.; SWISHER, C. N.; PATEL, D.; ROIZEN, N.; STEIN, L.; STEIN, M.; WITHERS, S.; MUI, E.; EGWUAGU, C.; REMINGTON, J.; DORFMAN, R.; MCLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clinical Infection Disease**. v. 23, p. 1055-60, 1996. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.5.1055>

WEINBERG, E.D. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. **Reviews of Infections Diseases**. p.814-831, 1984.

WILSON, D.C.; GROTENBREG, G.M.; LIU, K.; ZHAO, Y.; FRICKEL, E.M.; GUBBELS, M.J.; PLOEGH, H.L.; YAP, G. S. Differential regulation of effector- and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. **PLoS Pathology**. v. 6, p. 1-17, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000815>

WHITE, M.W.; RADKE, J.R.; RADKE, J.B. *Toxoplasma* development - turn the switch on or off? **Cell Microbiology**. v. 16, p. 466-72, 2014. <https://doi.org/10.1111/cmi.12267>

WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M.B.; JOHNSON, G.I. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiology Reviews**. v. 79, 143–180, 1999. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>

YAP, G.S., SHAW, M.H., LING, Y., SHER, A. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. **Microbes Infection**. v.8. p. 1174-8, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.031>

XU, B.; LIN, L.; ROTE, N.S. Identification Of A Stress-Induced Protein During Human Trophoblast Differentiation By Differential Display Analysis. **Biology of reproduction**, v.61, p. 681-686, 1999. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.681>

YAN, C.; LIANG, L.J.; ZHENG, K. Y.; ZHU, X.Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vector**, v.9, p.137, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1432-6>

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**. v. 14, p. 109-21, 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3598>

ZELDOVICH, V.B.; CLAUSEN, C.H.; BRADFORD, E.; FLETCHER, D.A.; MALTEPE, E.; ROBBINS, J.R.; BAKARDJIEV, A.I. Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. **PlosOne**. v.9, p.12, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003821>

ZENCLUSSEN, A.N. Adaptive Immune Responses During Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, p. 291-303, 2013. <https://doi.org/10.1111/aji.12097>