

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

Inibidores de ciclooxigenase (COX)-2 reduzem a infecção por *Toxoplasma gondii* (cepa RH) e modulam a resposta imune e a formação de corpos lipídicos em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo) e extravilosas (HTR-8/SVneo)

Guilherme de Souza

Uberlândia – MG
Dezembro – 2018

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

Inibidores de ciclooxygenase (COX)-2 reduzem a infecção por *Toxoplasma gondii* (cepa RH) e modulam a resposta imune e a formação de corpos lipídicos em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo) e extravilosas (HTR-8/SVneo)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, para obtenção
do grau de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Guilherme de Souza

Orientadora: Prof^a. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Co-orientadora: Msc. Rafaela José da Silva

Uberlândia – MG

Dezembro – 2018

DEDICATÓRIA

Após 5 anos, concluo uma das etapas mais importantes da minha vida. Essa longa jornada não seria possível sem o apoio da minha família. Dedico esse trabalho a minha Mãe Cássia, e aos meus irmãos Nathália e Augusto. Obrigado pelo apoio durante todo esse tempo. Em especial, dedico esse trabalho à minha irmã Luana, que é meu braço direito, e que sem o seu apoio nada disso seria possível. Obrigado pelo esforço que sempre fez para que eu pudesse me dedicar aos estudos e ir atrás dos meus objetivos. Espero algum dia poder retribuir tudo que fez e faz por mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha orientadora, Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, que com suas aulas desde o primeiro período me influenciou bastante para que eu pudesse entrar nessa área. Obrigado por abrir as portas do laboratório e ter me aceitado como seu aluno. Obrigado pela orientação, pela confiança, pelas conversas e dicas, pela presença em todos os momentos e por tantos outros ensinamentos que aprendi com você durante esses anos. Você é um grande exemplo de pessoa, professora e pesquisadora não só para mim, mas para toda a equipe do laboratório.

Agradeço a minha co-orientadora, Msc. Rafaela José da Silva, a quem serei grato eternamente. Obrigado pela paciência que teve em me ensinar, principalmente na cultura de células. Agradeço pela sua presença em todos os momentos, pela confiança, pelas dicas e os momentos de descontração durante esses anos. Tenho muito carinho e admiração por você, que também é um grande exemplo para mim.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha madrinha Ilda e meu padrinho Almir, que mesmo distantes, me apoiaram e ajudaram em todos os momentos.

Agradeço aos meus amigos: Débora, Bebel, Henrique, Lucas, Ari, Dieine, Paola e Thaís. Obrigado pela amizade e pelo apoio durante esses anos.

Agradeço à Professora Dra. Eloísa, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Imunofisiologia da Reprodução: Alessandra, Anna, Iliana, Juliana, Luana, Maria Thereza, Marina, Mayara, Pâmela, Priscila e Thádia. Obrigado por sempre estarem dispostas a ensinar e ajudar em tudo que precisei, pela confiança, pelo apoio de sempre e pelos momentos de descontração durante esses anos.

Agradeço as pessoas que passaram pelo laboratório, que me ensinaram e sempre estiveram dispostos em ajudar: Andressinha, Ariane, Camilla, Fernanda, Idessânia, Lara e Matheus.

Agradeço aos alunos da Professora Neide por sempre estarem dispostos a ajudar: Estér, Marcos Paulo e Yusmaris. Em especial, agradeço ao Mário César por ensinar a fazer a coloração e análise das imagens de LDs.

Agradeço o Professor Dr. Paulo Eugênio (INBIO), por disponibilizar o seu laboratório para realizar a captura de imagens.

Agradeço a todos os professores que tive durante a graduação e que contribuíram para a minha formação. Em especial, aqueles que tenho como exemplo e me ensinaram valores para a vida: Ariádine, Jimi, Maria José, Ana Ianinni, Vanessa e Melchior. Obrigado pelo apoio e todos os ensinamentos.

Agradeço à MinasBio, PIBID Biologia e Residência Pedagógica e as pessoas com quem eu tive a oportunidade de trabalhar e aprender muito.

Agradeço aos funcionários da Histologia: Ana e Fabrício, pelo apoio e disponibilidade.

Agradeço a CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

ACAT – Acil-CoA colesterol aciltransferase

ATGL – Lipase triglicéridica adiposa

CD – Grupo de diferenciação

COX – Ciclooxigenase

cPLA2 – Fosfolipase A₂ dependente de cálcio

DGAT2 – Acil-CoA diacilglicerol aciltransferase 2

DMSO – Dimetil sulfóxido

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

FABP – Proteína de ligação a ácidos graxos

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

hPL – Hormônio lactogênico placentário

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

LDL – Lipoproteína de baixa intensidade

LDs – Corpos lipídicos

LPS – Lipopolissacarídeos

MIC – Proteínas de micronemas

MIF – Fator de migração de macrófagos

NK – Célula “*natural killer*”

NO – Óxido nítrico

PAMPs – Padrões moleculares associados aos patógenos

PAT – Perilipina-adipofilina-TIP47

PGE – Prostaglandina

RE – Retículo endoplasmático

SFB – Soro fetal bovino

TAG – Triacilglicerol

TGF- β 1 – Fator de crescimento beta-1

Th – T helper

TLR – Receptor semelhante a Toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose congênita, ocasionando sequelas graves como aborto. Muitos patógenos desenvolveram mecanismos de evasão da resposta imune hospedeira. Um desses mecanismos é a indução da produção de mediadores inflamatórios, como ciclooxigenase (COX)-2 e prostaglandina E₂ (PGE₂) que favorece o crescimento destes patógenos. Muitos estudos têm demonstrado que COX-2 e PGE₂ são mediadores chaves para a disseminação e persistência da infecção por *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro. Esses mediadores são produzidos e armazenados em corpos lipídicos (LDs), organelas ricas em lipídios importantes para a manutenção de patógenos. Foi visto que LDs são aumentados durante a infecção por *T. gondii* em macrófagos e células musculares esqueléticas, porém nenhuma relação foi estabelecida ainda entre COX-2, resposta imune, LDs e carga parasitária durante infecção por *Toxoplasma* em células trofoblásticas humanas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel de COX-2 e LDs durante infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo) e extravilosas (HTR-8/SVneo). Células BeWo e HTR-8/SVneo foram tratadas com diferentes concentrações de inibidores de COX, Meloxicam, inibidor de COX-1 e COX-2, e Celecoxibe, inibidor específico de COX-2, com o objetivo de avaliar a viabilidade celular pelo MTT. Em seguida, células BeWo e HTR-8/SVneo foram infectadas por *T. gondii* e tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe por mais 24 horas. Após esse tempo, o índice de proliferação de *T. gondii* foi realizado pelo ensaio de β -galactosidase, e o sobrenadante da cultura foi utilizado para avaliar o perfil de citocinas pelo ensaio de ELISA. Posteriormente, células BeWo e HTR-8/SVneo foram infectadas ou não por *T. gondii* na presença ou ausência de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. Após esse tempo, foi realizada a coloração de corpos lipídicos com Oil Red O. Em seguida, células BeWo e HTR-8/SVneo foram infectadas por *T. gondii* e tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe por 24 horas. Após esse tempo, foi realizada a coloração de corpos lipídicos com Oil Red O. Nossos resultados demonstram que inibidores de COX-2 não diminuíram a viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo. Além disso, o tratamento com os inibidores de COX-2 foi capaz de diminuir a proliferação de *T. gondii* nas duas linhagens celulares. Posteriormente, nós observamos que a inibição de COX-2 induziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias em células BeWo e HTR-8/SVneo, como IL-6 e MIF, além de diminuir a produção de citocinas anti-inflamatórias em células BeWo, IL-4 e IL-10, e nas células HTR-8/SVneo, IL-4 e TGF- β 1. Em seguida, nós vimos que a infecção por *T. gondii* induziu a produção de LDs nas duas linhagens celulares, e que essa produção era aumentada com a adição de SFB. Posteriormente,

nós observamos que células BeWo e HTR-8/SVneo, infectadas e tratadas com inibidores de COX-2, diminuíram a produção de LDs. Assim, concluímos que o sucesso da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas é dependente de COX-2, uma vez que sua inibição induz resposta imune pró-inflamatória capaz de controlar o parasitismo e, ao mesmo tempo, diminui a disponibilidade de LDs em ambas linhagens celulares.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, ciclooxigenase-2, corpos lipídicos, trofoblasto humano, resposta imune.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that causes congenital toxoplasmosis, causing severe sequelae like miscarriage. Many intracellular pathogens have developed mechanisms of evasion of the host immune response. One of these mechanisms is the induction of the production of inflammatory mediators, such as cyclooxygenase (COX) -2 and prostaglandin E₂ (PGE₂), favoring the growth of pathogens. Many studies have shown that COX-2 and PGE₂ are key mediators for the spread and persistence of *Trypanosoma cruzi* infection in the host organism. These mediators are produced and stored in lipid droplets (LDs), lipid-rich organelles important for the maintenance of pathogens. It was seen that LDs are increased during *T. gondii* infection in macrophages and skeletal muscle cells, but no relationship has been established between COX-2, immune response, LD and parasitic load during *Toxoplasma* infection in human trophoblast cells. Thus, the objective of the present study was to evaluate the role of COX-2 and LDs during *T. gondii* infection in human villous trophoblasts cells (BeWo), and extravillous (HTR-8/SVneo). BeWo and HTR-8/SVneo cells were treated with different concentrations of COX inhibitors, Meloxicam, COX-1 and COX-2 inhibitor, and Celecoxib, a COX-2 specific inhibitor, in order to evaluate the cell viability by the MTT. Then, BeWo and HTR-8/SVneo cells were infected with *T. gondii* and treated with Meloxicam or Celecoxib for another 24 hours. After this, the proliferation rate of *T. gondii* was performed on the cells by the β -galactosidase assay, and the cell culture supernatant was used to evaluate the cytokine profile by the ELISA assay. Subsequently, BeWo and HTR-8/SVneo cells were infected or not with *T. gondii* in the presence or absence of fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. After this time, staining of lipid bodies with Oil Red O was performed. Then, BeWo and HTR-8/SVneo cells were infected with *T. gondii* and treated with Meloxicam or Celecoxib for 24 hours. After that time, staining of lipid bodies with Oil Red O was performed. Our results demonstrate that COX-2 inhibitors have not decreased the viability of BeWo and HTR-8 / SVneo cells. In addition, treatment with COX-2 inhibitors was able to decrease the intracellular proliferation of *T. gondii* in the two human trophoblast cell lineages. Later, we observed that inhibition of COX-2 induced secretion of pro-inflammatory cytokines in BeWo and HTR-8/SVneo cells, such as IL-6 and MIF, and decreased the production of anti-inflammatory cytokines in BeWo cells, IL-4 and IL-10, and in HTR-8/SVneo cells, IL-4 and TGF- β 1. Next, we saw that *T. gondii* infection induced the production of LDs in both cell lineages, and that this production was increased with the addition of FBS. Subsequently, we observed that BeWo and HTR-8/SVneo cells, infected and treated with COX-2 inhibitors,

decreased production of LDs. Thus, we conclude that the success of *T. gondii* infection in human trophoblastic cells is dependent on COX-2, since its inhibition induces a pro-inflammatory immune response capable of controlling parasitism and, at the same time, decreasing the availability of LD in both cell lineages.

Key words: *Toxoplasma gondii*, cyclooxygenase-2, lipid droplets, human trophoblast, immune response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>: características gerais.....	12
1.2. Resposta imune a <i>T. gondii</i>.....	14
1.3. Toxoplasmose.....	16
1.4. Células trofoblásticas humanas: BeWo e HTR-8/SVneo.....	17
1.5. Corpos lipídicos.....	18
1.6. Corpos lipídicos e interação com patógenos.....	19
1.7. Corpos lipídicos e <i>T. gondii</i>.....	20
1.8. Corpos lipídicos e mediadores inflamatórios.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo.....	24
4.2. Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i>.....	24
4.3. Ensaio de MTT: viabilidade celular.....	25
4.4. Infecção por <i>T. gondii</i> nas células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com inibidores de COX-2.....	25
4.5. Dosagem de citocinas.....	26
4.6. Quantificação de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não com <i>T. gondii</i> na presença ou ausência de SFB.....	27
4.7. Quantificação de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por <i>T. gondii</i> e tratadas ou não com inibidores de COX-2.....	28
4.8. Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Os tratamentos com inibidores de COX-2 não alteram a viabilidade celular em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	29
5.2. Inibidores de COX-2 reduzem a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	29

5.3. Inibidores de COX-2 induzem maior secreção de IL-6 e MIF e diminuem a produção de IL-4 e IL-10 em células BeWo infectadas com <i>T. gondii</i>	30
5.4. Inibidores de COX-2 induzem maior secreção de IL-6 e diminuem a produção de IL-4 e TGF- β 1 em células HTR-8/SVneo infectadas com <i>T. gondii</i>	31
5.5. A quantidade de corpos lipídicos aumenta com o tempo de infecção em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	33
5.6. A adição de SFB aumenta a quantidade de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	34
5.7. A quantidade de corpos lipídicos diminui em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com inibidores de COX-2.....	34
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	40
8. FIGURAS.....	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
10. ANEXOS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório do filo apicomplexa, que pode infectar todos os vertebrados de sangue quente, como as aves e os mamíferos, incluindo os seres humanos, representando uma preocupação significativa de saúde pública (DUBEY et al., 2014; YAN et al., 2016). O parasito foi descoberto em 1908 por Splendore em um coelho de laboratório em São Paulo, e na mesma época por Nicolle e Manceaux em um roedor africano, *Ctenodactylus gondii*, no instituto Pasteur de Tunis, na Tunísia (NEVES, 2004). O parasito ganhou uma atenção especial quando em 1923, na cidade de Praga, um oftalmologista relatou o caso de uma criança que faleceu com 11 meses de idade que apresentava hidrocefalia e cegueira, e na necropsia foram observados parasitos semelhantes a *T. gondii* (VERONESI; FOCACCIA, 1996; REMINGTON et al., 2006).

Morfologicamente, *T. gondii* possui uma estrutura alongada, sendo a região anterior afilada e a região posterior arredondada, mas pode também apresentar um formato oval, indicando o início do processo de divisão celular (REY, 2001; SOUZA et al., 2010). Possui um núcleo, que está situado na região central ou mais próximo da extremidade posterior, e organelas típicas de organismos eucariontes (mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomo) (DUBEY et al., 1998; DUPONT et al., 2012). Além disso, o parasito possui na região anterior organelas especializadas, como o conóide, micronemas, roptrias, grânulos densos e apicoplasto, formando o complexo apical. Essas organelas são importantes para a fixação e invasão na célula hospedeira (SOUZA et al., 2010; PENG et al., 2011).

O conóide é uma estrutura em forma de cone, formada por três anéis de microtúbulos, que são importantes para manter a forma do parasito, além de estar envolvido com a mobilidade e o direcionamento de vesículas secretórias durante o mecanismo de invasão (DUBEY et al., 1998; HU et al., 2006). A entrada do parasito na célula hospedeira é um processo rápido (15 a 30 segundos) (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Já as micronemas são as primeiras organelas a secretarem suas proteínas, e estão relacionadas com o reconhecimento e adesão do parasito à célula hospedeira (TOMLEY; SOLDATI, 2001). O conteúdo das micronemas é liberado nos momentos iniciais da interação com a célula hospedeira, em um processo regulado por Ca^{2+} (LOVETT et al., 2002). A proteína MIC-2 está presente em todos os estágios invasivos

do parasito e possui importante papel no reconhecimento da célula hospedeira e nos movimentos que o parasito realiza para a invasão celular (SIBLEY, 2010).

Posteriormente, as roptrias secretam suas proteínas durante a invasão do parasito, sendo importante para a formação do vacúolo parasitóforo (SOUZA et al., 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os grânulos densos secretam suas proteínas dentro do vacúolo parasitóforo, possibilitando que o parasito possa evadir das respostas da célula hospedeira. Além disso, as proteínas liberadas são importantes para a formação de túbulos especializados, possibilitando que o parasito possa competir com a célula hospedeira por metabólitos para a sua sobrevivência (MERCIER et al., 2005; CESBRON-DELAUW et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

Por último, o apicoplasto é um plastídeo não fotossintetizante envolvido por quatro membranas e localizado na região anterior ao núcleo. No apicoplasto ocorre vias metabólicas importantes, como a biossíntese de ácidos graxos e algumas etapas da síntese da heme (SEEBER, 2003; THOMSEN-ZIEGER et al., 2003).

T. gondii possui três estágios infecciosos: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (DUBEY et al., 1998; BOLAIS et al., 2017). Os taquizoítas estão presentes na fase aguda da infecção, com alta taxa de proliferação e disseminação nos tecidos, como o tecido muscular, ocular, nervoso e na placenta. Eles se multiplicam dentro de um compartimento intracelular denominado vacúolo parasitóforo, em um processo chamado de endodiogenia (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; DUBEY, 2010; SOUZA et al., 2010).

Por pressão do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas se convertem em bradizoítas, passando para um estágio de multiplicação mais lenta, formando os cistos teciduais, sendo prevalente em infecções crônicas. No interior dos cistos, os bradizoítas se dividem por endodiogenia, formando duas células filhas. A parede membranosa que recobre os cistos permite uma maior resistência dos bradizoítas às enzimas presentes no suco gástrico, permitindo sua transmissão por meio da ingestão (FERGUSON, 2004; SOUZA et al., 2010). Cistos contendo bradizoítas viáveis podem persistir por anos no hospedeiro (FERGUSON; HUTCHISON, 1987; FRENKEL, 1988), sendo o cérebro e o músculo os locais mais comuns da infecção, embora cistos também tenham sido encontrados no pulmão, fígado e rins (DUBEY et al., 1998).

Os esporozoítas são encontrados no interior de oocistos maduros, sendo formados no trato intestinal e liberados junto às fezes dos hospedeiros definitivos, os felinos. Esses oocistos são estruturas ovóides que em ambientes favoráveis de umidade, calor e clima, sofrem esporulação, contendo dois esporocistos, e cada um possui quatro esporozoítas. Os esporozoítas

são liberados para o meio externo junto às fezes desses animais (MONTROYA, LIENSENFELD, 2004; DUBEY, 2010; SOUZA et al., 2010; YAN et al, 2016).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxênico, tendo como hospedeiros definitivos os gêneros *Felis* e *Lynx*, e hospedeiros intermediários as aves e mamíferos, incluindo o homem (REY, 2008). Após ingestão de cistos contendo bradizoítas pelos felinos, ocorre a liberação de parasitos na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, onde se replicam por esquizogonia e formam esquizontes. O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos. Estes merozoítos dão origem aos gametas, e havendo fecundação, formam-se oocistos. Após cair na luz intestinal, os oocistos são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais. A ingestão de alimentos contaminados, tanto com cistos quanto com oocistos, pode levar a infecção de hospedeiros intermediários, pois estes liberam bradizoítas e esporozoítas, respectivamente, que em seguida vão se transformar em taquizoítas capazes de invadir e se disseminar pelas células do indivíduo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; YAN et al., 2016). Para os seres humanos, as vias mais importantes de transmissão são através da ingestão de carne mal cozida contendo cistos, vegetais mal lavados, água ou solo contaminado com oocistos e via transmissão vertical, ou seja, da mãe para o feto ou embrião (ALVARADO-ESQUIAVEL et al., 2017; BOLAIS et al., 2017).

1.2. Resposta imune a *T. gondii*

A resposta imune contra *T. gondii* é mediada primariamente por células T helpers 1 (Th1), e requer componentes da resposta imune inata e adaptativa, envolvendo interações entre o parasito, monócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células *natural killers* (NKs) (CARRUTHERS, 2002).

As células da imunidade inata possuem receptores semelhantes a Toll (TLRs) que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), dando início a ativação do sistema imune. O TLR11 reconhece a proteína profilina do parasito, que é importante para a sua mobilidade e invasão da célula hospedeira (YAROVINSKY et al., 2005), desencadeando a produção de interleucina (IL)-12 em células dendríticas (YAROVINSKY et al., 2008). O TLR2 também contribui para a resposta do hospedeiro contra *T. gondii*, reconhecendo a molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasito (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). TLR4 também reconhece GPIs do parasito, sugerindo que TLR2 e TLR4 podem funcionar cooperativamente durante a infecção por *T. gondii*. Segundo Denkers e colaboradores (2010), ainda não há evidências de que exista um TLR principal que controle

a resposta imune contra *T. gondii*, sugerindo que a resistência do hospedeiro à infecção está relacionada a vários ligantes de TLRs.

No início da infecção, *T. gondii* é reconhecido e estimula a síntese de IL-12 nas células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, e induz a síntese de interferon (IFN)- γ pelas células NKs. Adicionalmente, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) pode agir em sinergia com a IL-12, otimizando a produção de IFN- γ por essas células (GAZZINELLI et al., 1993). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias está associada com a ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T CD4+ e CD8+, que atuam produzindo e secretando diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), e induz o aumento ainda maior nos níveis de IL-12 e IFN- γ (MILLER et al., 2009; MELO et al., 2011a). O IFN- γ , por sua vez, ativa as células dendríticas, os macrófagos e os neutrófilos, promovendo a redução ou a eliminação do parasito (BUZONI-GATEL et al., 2006). Quando os macrófagos são ativados pelo IFN- γ , eles produzem óxido nítrico, permitindo uma ação tóxica contra o parasito. Além disso, essa citocina induz a produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), levando a degradação do triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito, o que permite a inibição da replicação ou a destruição de *T. gondii* por essas células (PFEFFERKORN et al., 1986; SILVA et al., 2002). Além do IFN- γ e da IL-12, as células Th1 também secretam outras citocinas pró-inflamatórias que são importantes no combate a infecção por *T. gondii*, como a IL-6, MIF e TNF- α .

No entanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode levar o hospedeiro a morte (GAZZINELLI et al., 1992; LANG et al., 2007). Assim, é importante que tenha um balanço entre um perfil das respostas Th1 e Th2. Esse balanço pode ser mediado pela produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β 1, que atuam diminuindo a produção de NO em macrófagos, a atividade citotóxica de células NK e a maturação de células dendríticas (WILLE et al., 2001; SAKAGUCHI, 2005; AKBAR et al., 2007).

Dessa forma, o combate à infecção por *T. gondii* é mediado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células do sistema imune inato e adaptativo. No entanto, *T. gondii* é capaz de evadir da resposta imune do hospedeiro. Portanto, o sucesso da infecção ou o combate ao parasito está associado com o balanço entre a resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão utilizados por *T. gondii* (MILLER et al., 2009; MELO et al., 2011a).

1.3. Toxoplasmose

T. gondii é o agente causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos. Estima-se que 30 a 50% da população mundial esteja infectada pelo parasito (IMAM et al., 2017). A sorologia positiva para *T. gondii* é muito variável em diferentes regiões, variando de 10 a 30% na América do Norte, sudoeste asiático e norte da Europa. Em países da região central e sul da Europa a sorologia é de 30 a 50%. Na América Latina e países tropicais africanos a prevalência é alta, podendo variar de 30 a 90% (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; DUBEY et al., 2014). Essas diferenças são associadas com a alimentação, o preparo da comida, o tratamento adequado da água e a intensidade da exposição ambiental (BOLAIS et al., 2017).

O período inicial da infecção é caracterizado pela fase aguda da infecção, onde os taquizoítas se multiplicam rapidamente em diferentes tipos celulares. A maioria dos indivíduos imunocompetentes são assintomáticos. No entanto, algumas manifestações clínicas podem ocorrer, como a febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e cefaleia (HILL, DUBEY, 2002). Após 2 a 3 semanas de infecção, devido a uma resposta eficaz do hospedeiro, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas, formando os cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da infecção (HILL et al., 2005). Em pacientes imunocomprometidos (pacientes com AIDS, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças autoimunes), pode ocorrer reativação da infecção, onde os bradizoítas se convertem em taquizoítas, podendo ser fatal para o hospedeiro (TENTER et al., 2001; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A toxoplasmose congênita é considerada uma das formas mais graves da doença, e ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação, alcançando assim a circulação e os tecidos fetais (MONTROYA; REMINGTON, 2008; KODJIKIAN, 2010; VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016). Nesse sentido, a placenta desempenha um papel fundamental, pois é uma barreira natural que protege o feto a exposição do parasito (ABBASI et al., 2003). O risco de infecção fetal e o comprometimento fetal dependem do estágio da gravidez quando ocorre a infecção materna. Assim, o risco de infecção fetal no primeiro trimestre é em torno de 10%, no entanto o comprometimento fetal é grave e pode levar ao aborto. No segundo trimestre, as chances de transmissão aumentam para 30%, enquanto que no terceiro trimestre pode variar entre 60 a 90%, mas o comprometimento fetal é menor (DUNN et al., 1999; MCLEOD et al., 2009; GARCIA-MERIC et al., 2010). Os sintomas da toxoplasmose congênita incluem a coriorretinite, hidrocefalia, microcefalia, epilepsia, cegueira, estrabismo, calcificações intracranianas, entre outros sintomas (JONES et al., 2003; LI

et al., 2014). Os bebês infectados congenitamente frequentemente são assintomáticos ao nascer, podendo desenvolver doenças durante a infância (WALLON et al., 2001).

O tratamento clássico para a toxoplasmose se baseia no uso da espiramicina ou sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico. A espiramicina é usada durante a fase aguda da infecção, mas quando não há evidências de infecção fetal, reduzindo assim o risco de transmissão do parasito pela placenta (MCLEOD et al., 2006). Caso a infecção fetal seja confirmada, o tratamento com a espiramicina é interrompido e passa a ser utilizada a associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico (MONTROYA; LIENSEFELD, 2004; MONTROYA; REMINGTON, 2008; MCLEOD et al., 2009). No entanto, a utilização desses medicamentos não é capaz de eliminar completamente a infecção, além de serem consideradas tóxicas e podem ocasionar efeitos colaterais para a mãe ou para o feto. Nesse sentido, é importante a busca por novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de diminuir a transmissão vertical e que minimizem os efeitos colaterais. Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que a Azitromicina foi mais eficiente em controlar o parasitismo do que os medicamentos convencionais em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) (RIBEIRO et al., 2017). Em outro estudo do nosso grupo, foi demonstrado que a Enrofloxacin e o Toltrazuril também foram capazes de diminuir o parasitismo em células BeWo e em vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e MIF (DA SILVA et al., 2017). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é importante para o tratamento da toxoplasmose congênita, visto que essa doença é um problema de saúde pública mundial.

1.4. Células trofoblásticas humanas: BeWo e HTR-8/SVneo

O trofoblasto é uma população celular que constitui a interface materno-fetal. Essas células são responsáveis pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio, nutrição do embrião e formação da porção fetal da placenta (MOORE et al., 1993; FITZGERALD et al., 2008). Durante o processo de implantação, esse trofoblasto se diferencia em duas subpopulações: o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto (MOORE et al., 1993; DROGUETT et al., 2017).

O sinciciotrofoblasto é uma camada multinucleada que forma a superfície externa dos vilos placentários e entra em contato direto com o sangue materno, sendo formado a partir de células do citotrofoblasto (HUPPERTZ; BORGES, 2008; HUPPERTZ; GAUSTER, 2011; MAYHEW, 2014). O citotrofoblasto é formado por células individualizadas, com alta capacidade proliferativa e são divididas em: trofoblasto viloso e extraviloso. O trofoblasto

viloso é importante para a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto, enquanto que o trofoblasto extraviloso é responsável pela migração e invasão na decídua (MIDGLEY et al., 1963; APLIN, 1991). Portanto, o trofoblasto é uma importante barreira física que precisa ser mantida intacta a fim de proteger o organismo contra o ataque de patógenos (LIEMPI et al., 2014). Para compreender melhor o papel do trofoblasto no ambiente placentário, especialmente na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, algumas linhagens celulares foram desenvolvidas para estudos *in vitro*.

Células BeWo foram isolados de um coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey. Essas células possuem muitas características de trofoblasto humano, pois secretam hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol (WOLFE, 2006). Estudos do nosso grupo demonstraram que células BeWo foram susceptíveis a infecção por *T. gondii* na presença de IL-10 e fator de crescimento beta-1 (TGF- β 1) (BARBOSA et al., 2008).

Células HTR-8/SVneo foram geradas a partir de isolados de trofoblasto extraviloso de placentas de primeiro trimestre. Posteriormente, elas foram transfectadas com um plasmídeo contendo o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (GRAHAM et al., 1993). Entre todas as linhagens de trofoblasto extraviloso, a HTR-8/SVneo é a mais utilizada para estudos de invasão, proliferação e regulação (DING et al., 2016; YANG et al., 2016).

Portanto, células BeWo e HTR-8/SVneo são consideradas modelos apropriados para a realização de estudos *in vitro* sobre a interface materno-fetal.

1.5. Corpos lipídicos

Corpos lipídicos, também conhecidos como gotículas lipídicas (LDs), são organelas intracelulares ricas em lipídios presentes em todas as células eucarióticas (MURPHY, 2001) e em bactérias (SAKA; VALDIVIA, 2012). LDs estão envolvidos em uma variedade de funções, como metabolismo lipídico, sinalização celular, além de serem encontrados em condições inflamatórias e infecciosas (BOZZA et al., 2007; FARESE; WALTHER, 2009; BELLER et al., 2010).

LDs são estruturas esféricas constituídas principalmente de triacilgliceróis (TAGs), colesterol e diacilglicerol circundados por uma camada única de fosfolipídios (TAUCHI-SATO et al., 2002). A composição lipídica varia de acordo com o tipo celular. Nos adipócitos, os TAGs estão em abundância, enquanto que em macrófagos os esteróis estão mais presentes. Os fosfolipídios encontrados na monocamada de LDs consistem principalmente de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol (PRATTES et al., 2000; TAUCHI-SATO et al., 2002;

BARTZ et al., 2007). Mais de 160 espécies lipídicas foram identificadas em LDs (BARTZ et al., 2007). Na monocamada de LDs são encontradas proteínas que estão envolvidas na biogênese, incorporação e acúmulo de lipídios e na mobilização dessas organelas (GREENBERG et al., 1991; BRASAEMLE et al., 1997). As principais proteínas estruturais fazem parte da família perilipina, anteriormente denominadas de proteínas da família PAT (perilipina-adipofilina-TIP47). Entre essas proteínas, estão a perilipina 1, perilipina 2 (proteína relacionada a diferenciação de adipócitos - ADRP), perilipina 3 (“tail interacting protein” de 47 kDa – TIP47), perilipina 4 (S3-12) e perilipina 5 (LSDA5, LSDP5, MLDP e OXPAT) (ITABE et al., 2017). Além disso, estão presentes enzimas como a acil-CoA diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2) e acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT), que são responsáveis pela síntese dos principais lipídios de LDs (TAGs e colesterol). Os LDs também possuem a enzima lipase triglicéridica adiposa (ATGL), sendo importante na degradação de lipídios (MEYERS et al., 2017).

Muitos estudos mostram que os LDs são originados do retículo endoplasmático, pois muitas das enzimas necessárias para a biossíntese de TAGs e a esterificação de esteróis estão presentes no RE (MURPHY, 2001). Além disso, a composição química da monocamada de fosfolipídios de LDs é semelhante ao do RE (TAUCHI-SATO et al., 2002; ROBENEK et al., 2006; BARTZ et al., 2007). O modelo prevalente de biogênese de LDs mostra que os lipídios neutros são acumulados entre os dois folhetos da membrana plasmática do RE, e ao alcançarem determinado tamanho eles se desprendem levando consigo uma monocamada de membrana (MURPHY, 2001; KALANTARI et al., 2010). A geração de LDs pode ser estimulada pela presença de ácidos graxos no meio extracelular, ácido araquidônico e lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas (PACHECO et al., 2002; BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2005).

1.6. Corpos lipídicos e interação com patógenos

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que muitos patógenos têm como alvos os LDs, incluindo vírus, bactérias intracelulares e protozoários. Sabe-se que esses patógenos buscam por recursos lipídicos para a sua manutenção e sobrevivência, no entanto estudos demonstram que LDs também podem ser mediadores centrais de respostas imunes (SAKA; VALDIVIA, 2012).

O vírus da hepatite C (HCV) utiliza os LDs para a montagem de novos virions (BOULANT et al., 2007). Em outro estudo, eles demonstraram que um vírus intimamente relacionado com o HCV, o GBV-B, que está relacionado a hepatite aguda em micos, também foi capaz de utilizar LDs para a sua replicação (HOPE et al., 2002). Cheung e colaboradores

(2010) mostraram que proteínas do rotavírus, especialmente NSP5, NSP2, VP1, VP2 e VP6, estavam associadas com proteínas estruturais de LDs, como perilipina 1 e a perilipina 2 (ADRP), e quando a formação de LDs foi inibida, isso afetou negativamente a sua replicação. Portanto, os vírus criaram mecanismos para interagir com LDs e utilizar essas organelas para a montagem de novas partículas virais.

A infecção de células epiteliais com a bactéria *Chlamydia trachomatis* levou a produção de LDs e estes estavam associadas com o vacúolo contendo o patógeno. Além disso, a inibição da formação de LDs diminuiu a replicação de *C. trachomatis*, mostrando a importância dessa organela para a sua replicação (KUMAR et al., 2006). Em macrófagos infectados por *Mycobacterium bovis* BCG, houve um aumento na formação de LDs mediada por TLR2 (D'AVILLA et al., 2006).

Além disso, protozoários também são capazes de induzir a formação de LDs. O *Trypanosoma cruzi* também induz acúmulo de LDs em macrófagos (MELO et al., 2003), e assim como em *C. trachomatis*, esses LDs são recrutados para a região do vacúolo parasitóforo (COCCHIARO et al., 2008). Estudos mostram que *Plasmodium falciparum* aumentou a produção de LDs em eritrócitos, enquanto que *Plasmodium berghei* aumenta a quantidade dessas organelas em hepatócitos (SIMÕES et al., 1992; RODRÍGUEZ-ACOSTA et al., 1998).

Portanto, o acúmulo de LDs é observado após a infecção por uma variedade de patógenos. No entanto, os mecanismos de indução, assim como a captação de LDs por esses patógenos são ainda pouco elucidados.

1.7. Corpos lipídicos e *T. gondii*

Assim como outros protozoários, *T. gondii* também induz a formação de LDs na célula hospedeira para sua manutenção e replicação (GOMES et al., 2014, HU et al., 2017; NOLAN et al., 2017). Sabe-se que *T. gondii* é auxotrófico para o colesterol (COPPENS; JOINER, 2003), e estudos já mostraram que o parasito pode capturar este lipídio de lipoproteínas de baixa intensidade (LDL) (COPPENS et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2005). Uma vez internalizado pelo parasito, esse colesterol pode ser esterificado e armazenado em seus LDs para a sua manutenção e replicação (NISHIKAWA et al., 2005).

Estudos recentes demonstraram que macrófagos peritoneais murinos, assim como células do músculo esquelético, aumentaram a quantidade de LDs quando infectadas por *T. gondii*. Esta formação se correlaciona com o aumento de prostaglandina E2 (PGE₂), um potente inibidor da resposta Th1, e uma diminuição da produção de óxido nítrico foi observada nestas células (GOMES et al., 2014; MOTA et al., 2014). Em outro estudo, observou-se que, em

fibroblasto humano (HFF) e células epiteliais uterinas humanas (HeLa), a quantidade de LDs aumentavam de acordo com o tempo da infecção, e que após um período havia um declínio dessas organelas devido a saída do parasito da célula hospedeira. Adicionalmente, eles demonstraram que LDs durante a infecção se localizam em torno do vacúolo parasitóforo (NOLAN et al., 2017). Além disso, estudos mostram que no decorrer da infecção, os ácidos graxos presentes nos LDs são capturados pelo parasito (NOLAN et al., 2017; PERNAS et al., 2018).

A captação desses ácidos graxos representa um grande desafio para os patógenos, pois além de estarem armazenados em LDs, eles são utilizados pelas mitocôndrias para produzir energia através da β -oxidação (NOLAN et al., 2017). Pernas e colaboradores (2018) mostraram que no estágio inicial (6h) e intermediário (12h) da infecção em células de fibroblasto embrionário murino (MEF), as mitocôndrias se alongavam em torno do vacúolo parasitóforo, o que aumentou a captação de ácidos graxos por essas organelas e consequentemente diminuiu a captação de *T. gondii*, sugerindo que o metabolismo mitocondrial durante a infecção pode controlar o crescimento do parasito.

O aumento da síntese de LDs em células infectadas pode estar relacionado com mecanismos regulatórios das enzimas que participam da síntese de LDs. Nesse sentido, Hu e colaboradores (2017) observaram diferentes níveis de transcrição nessas enzimas nas células infectadas. Eles observaram que a expressão de DGAT2, que converte o diacilglicerol (DAG) e os ácidos graxos livres em triacilglicerol, e da proteína de ligação a ácidos graxos (FABP5), que carrega os ácidos graxos dentro da célula, foram aumentados nas células infectadas. Esses dados sugerem que o aumento de LDs no hospedeiro infectado pode ser causado por alterações transcricionais nas proteínas envolvidas com a formação de LDs. Além disso, eles demonstraram que a capacidade de aumentar a formação de LDs era mantida nas três cepas de *T. gondii* (Tipo I- RH; Tipo II- ME-49, Tipo III-CEP) (HU et al., 2017). Em outro estudo, foi demonstrado que *T. gondii* aumenta a quantidade de autofagossomos associado com LDs, sugerindo que o parasito explora a lipofagia do hospedeiro para captar os ácidos graxos dos LDs (PERNAS et al., 2018).

Portanto, *T. gondii* consegue induzir o aumento de LDs na célula hospedeira, e consequentemente captar nutrientes para a sua sobrevivência. No entanto, os mecanismos envolvidos na aquisição de lipídios precisam ser mais elucidados.

1.8. Corpos lipídicos e mediadores inflamatórios

Corpos lipídicos são importantes para a produção de mediadores inflamatórios (BOZZA et al., 2011). Essas organelas armazenam o ácido araquidônico (AA), que está esterificado em fosfolipídios e lipídios neutros. Quando a célula detecta um estímulo adequado, o AA é liberado, sendo um processo mediado por cPLA2 (fosfolipase A₂ dependente de cálcio), e convertido em prostaglandina E₂ (PGE₂) pela enzima COX, que existe em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é considerada constitutiva, e é expressa na maioria dos tecidos constantemente e é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal dos tecidos. A COX-2 é considerada induzida, uma vez que o aumento da sua expressão está relacionado geralmente a estímulos como LPS, citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos e linfócitos, e lesões celulares sejam elas químicas ou físicas (BATLOUNI, 2010). Estudos mostram que a biogênese de LDs está relacionada com uma maior formação desses mediadores inflamatórios (BOZZA et al., 1997; MELO et al., 2003; MOREIRA et al., 2009). Em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi*, a produção de PGE₂ foi positivamente correlacionada com a formação de LDs (MELO et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que macrófagos infectados com bacilos Calmette-Guerin (BCG) de *Mycobacterium bovis*, a produção de PGE₂ era sintetizada predominantemente em LDs (D'AVILA et al., 2006).

A PGE₂ é um potente inibidor da resposta do tipo Th1 e da produção de óxido nítrico, favorecendo o crescimento de patógenos (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000). Estudos do nosso grupo demonstraram que células BeWo estimuladas com baixas concentrações de MIF mostraram forte fosforilação de ERK1/2 e significativa produção de PGE₂, o que coincidiu com uma maior proliferação intracelular de *T. gondii*. Em contrapartida, altas concentrações de MIF em células BeWo não fosforilaram ERK1/2 e não contribuíram para a liberação de PGE₂, controlando a carga parasitária, mostrando a importância deste mediador lipídico durante a infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (BARBOSA et al.; 2014). Além disso, outros estudos mostraram que altos níveis de PGE₂ favoreceram o crescimento de *T. cruzi* em camundongos BALB/c. No entanto, quando foi feita a inibição de COX-2, e conseqüentemente a diminuição de PGE₂, reduziu a parasitemia de *T. cruzi* e aumentou a sobrevivência desses animais (ADBALLA et al, 2008).

Além da função de LDs na produção de eicosanoides, essas organelas também podem ter outros papéis na resposta do hospedeiro a infecções por patógenos. Em células de Schwann infectadas por *Mycobacterium leprae*, observou-se uma alta quantidade de LDs e que se correlacionava com o aumento da produção de PGE₂ e IL-10, sugerindo que essas organelas participam na produção de mediadores da imunidade inata no contexto da infecção bacteriana

(MATTOS et al., 2011). Entretanto, a associação de citocinas com LDs precisa ainda ser elucidada.

Nesse sentido, muitos trabalhos demonstram a relação de COX-2 e PGE₂ durante infecções causadas por patógenos, mas poucos estudos mostram a relação de COX-2 com corpos lipídicos em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo) e extravilosas (HTR-8/SVneo) mediante infecção por *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é um problema de saúde pública mundial. Com isso, é importante que se tenham estudos que esclareçam os mecanismos de invasão do parasito na interface materno-fetal. Sabe-se que os corpos lipídicos são importantes para a produção e armazenamento de mediadores inflamatórios, como COX-2 e prostaglandinas, e que esses favorecem o crescimento de patógenos como *T. cruzi*. Porém, não existem dados na literatura que correlacionem COX-2, corpos lipídicos, células trofoblásticas, resposta imune e *T. gondii*. Com isso, esse trabalho buscou estabelecer o papel de ciclooxigenases na infecção por *T. gondii*, resposta imune e na produção de corpos lipídicos em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) e extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo). Os resultados obtidos são importantes, pois novos conhecimentos acerca da interação parasito-hospedeiro na interface materno-fetal podem ser estabelecidos, a fim de implementar novas formas terapêuticas e/ou preventivas para a toxoplasmose congênita, trazendo melhores condições de vida para as crianças infectadas congenitamente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o papel de ciclooxigenases, especialmente COX-2, durante a infecção por *T. gondii* e o seu efeito na resposta imune e formação de corpos lipídicos em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) e extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de inibidores de COX-2 (Meloxicam e Celecoxibe) na viabilidade celular em células BeWo e HTR-8/SVneo.

- Avaliar o efeito de inibidores de COX-2 na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo.
- Avaliar o efeito de inibidores de COX-2 na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não.
- Avaliar o efeito da infecção por *T. gondii* na produção de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo.
- Avaliar o efeito de inibidores de COX-2 na produção de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

Células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) foram adquiridas do “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Manassas, VA, EUA). As células trofoblásticas humanas extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) foram cedidas pela professora Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil). Ambas as células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014; GUIRELLI et al., 2015). De acordo com o Comunicado N°13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP) declara que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo 1).

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

Taquizoítas de *T. gondii*, clone 2F1, que são derivados da cepa altamente virulenta RH e que expressam constitutivamente o gene da β -galactosidase, foram cedidos pelo Professor Dr. Vern Carruthers, da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os taquizoítas foram propagados em células BeWo mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37 °C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014).

4.3. Ensaio de MTT: viabilidade celular

A viabilidade das células BeWo e HTR-8/SVneo frente aos tratamentos com Meloxicam (inibidor de COX-1 e COX-2) ou Celecoxibe (inibidor específico de COX-2) foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Células BeWo e HTR-8/SVneo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, homogeneizadas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e calculadas para uma proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células, respectivamente, a cada 200 μ l de meio a 10% de SFB em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂, as células foram tratadas com concentrações crescentes de Meloxicam (Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brazil) (1 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 250 μ g/mL e 500 μ g/mL) ou Celecoxibe (Pfizer Pharmaceuticals LLC, Guarulhos, SP, Brazil) (1 μ g/mL e 5 μ g/mL) durante 24 horas em meio RPMI sem adição de SFB. No entanto, o Celecoxibe foi diluído em meio RPMI contendo dimetil sulfóxido (DMSO) com o objetivo de melhorar a diluição do inibidor. Para verificar se o DMSO poderia ser tóxico para as células, nós tratamos as células com 0,005% de DMSO em meio RPMI, a porcentagem usada no tratamento com Celecoxibe. Como controle, as células foram tratadas somente com meio RPMI sem adição de SFB e inibidores (meio).

Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80°C para posterior dosagem de citocinas. As células foram incubadas com 10 μ l de MTT (0,5 mg/mL) acrescido de 90 μ L de meio a 10% de SFB em estufa durante 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μ L de solução contendo SDS a 10% e N, N-dimetil formamida a 50% (MOSMANN, 1983). Após 30 minutos de incubação, foi obtida a densidade óptica (DO) a 570nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) e os resultados foram expressos como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação aos controles (100%). Foram realizados quatro experimentos independentes em nonoplicata.

4.4. Infecção por *T. gondii* nas células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com inibidores de COX-2

Após avaliar a citotoxicidade dos inibidores pelo ensaio do MTT em células BeWo e HTR-8/SVneo, foi avaliada a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas ou não com os diferentes inibidores.

Células BeWo e HTR-8/SVneo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, homogeneizadas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e calculadas para uma

proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células a cada 200 μ l de meio, respectivamente. Em seguida, as células foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% de SFB a 37° C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção de 1 parasito por célula (1:1) em meio RPMI sem adição de SFB. Após 3 horas de infecção, as células foram tratadas com Meloxicam (10 μ g/mL e 250 μ g/mL) ou Celecoxibe (1 μ g/mL e 5 μ g/mL) por adicionais 24 horas. Como controle, as células foram infectadas, mas não tratadas. As células nas placas foram analisadas quanto à proliferação intracelular de *T. gondii* por meio de um ensaio colorimétrico de β -galactosidase (BARBOSA et al., 2014).

Brevemente, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas. Em seguida, foram adicionados às células 100 μ L de tampão de lise RIPA (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, e 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7.5), 160 μ L de tampão de ensaio (100 mM de tampão fosfato, pH 7,3, 102 mM de β -mercaptoetanol, 9 mM de MgCl₂) e 40 μ L do substrato CPRG (clorofenol red- β -D-galactopiranosídeo; Roche) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570nm usando leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLan, VA, EUA). Foi construída uma curva padrão por meio de diluições seriadas, em duplicata de taquizoítas de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a 5×10^5 /poço/100 μ L. Foram adicionados na curva padrão as soluções de tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato CPRG e a densidade óptica foi mensurada. Os dados foram apresentados como índice de parasitismo de *T. gondii* (número de taquizoítas totais) em relação à curva padrão. Foram realizados quatro experimentos independentes em nonoplicata.

4.5. Dosagem de citocinas

As citocinas humanas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MIF e TGF- β ₁ foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo provenientes das diversas condições experimentais descritas acima. As dosagens destas citocinas nos sobrenadantes foram realizadas usando o teste imunoenzimático ELISA, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA; R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10, anti-TNF- α , anti-MIF e anti-TGF- β ₁ (BD Biosciences) *overnight* a 4 °C e anti-MIF (R&D Systems) *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS Tween 0,05% para posterior bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS a 10% de SBF (IL 4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e TGF- β ₁) e PBS a 1% de soro albumina bovina (BSA)

para MIF. Após 1 hora, as placas foram novamente lavadas, e as amostras e curvas padrões foram adicionadas e incubadas por mais 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram submetidas a consecutivas lavagens e em seguida os anticorpos de detecção anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10, anti-TNF- α e anti-TGF- β_1 conjugados com estreptavidina acoplada a peroxidase foram acrescentados ao sistema por adicionais 1 hora; e anti-MIF por 2 horas, todos a temperatura ambiente. Para MIF, as placas foram lavadas, e foi adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por mais 20 minutos. Por fim, as placas foram lavadas e foi acrescentado 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) para a detecção dos imunocomplexos. Após a placa revelar, foi adicionado H₂SO₄ para parar a reação. A leitura da placa foi realizada em uma leitora de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) a 450 nm. Os dados foram demonstrados em pg/mL de acordo com a curva padrão (limites de detecção - IL-4: 7,81 pg/mL; IL-6: 4,7 pg/mL; IL-8: 3,125 pg/mL, IL-10: 7,8 pg/mL, TNF- α : 7,8 pg/mL; MIF: 7,8 pg/mL e TGF- β_1 : 125 pg/mL). Foram realizados três experimentos independentes em nonoplicata.

4.6. Quantificação de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* na presença ou ausência de SFB

Células BeWo e HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares (13 mm) na proporção de 5×10^4 a cada 200 μ l, durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, taquizoítas de *T. gondii* foram adicionados ou não nas placas na proporção de 1:1 com adição de SFB durante 6 e 24 horas a 37° C e 5% de CO₂. Após os tempos de infecção, as células foram processadas para análise da quantidade de LDs. Células não infectadas foram usadas como condição controle. Este experimento tem como objetivo avaliar a formação de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* nos tempos de 6 e 24 horas.

Posteriormente, células BeWo e HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares (13 mm) na proporção de 5×10^4 a cada 200 μ l, durante 24 horas a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, taquizoítas de *T. gondii* foram adicionados ou não nas placas na proporção de 1:1 na presença ou ausência de SFB durante 24 horas a 37° C e 5% de CO₂. Após o tempo de infecção, as células foram processadas para análise da quantidade de corpos lipídicos. Células não infectadas e não tratadas com SFB foram usadas como condição controle. Este experimento tem como objetivo avaliar o efeito do SFB na produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii*.

Para identificar os corpos lipídicos, as células foram fixadas em formol a 3,7% diluído em HBSS livre de Ca²⁺/Mg²⁺ (pH 7.4) por 10 minutos e lavadas com propileno glicol 100% por

5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com Oil Red O (0,5%, diluído em propileno glicol 100%) (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) durante 10 minutos a 60° C (MELO et al., 2011). Posteriormente, as células foram lavadas com propileno glicol 85% por 5 minutos em temperatura ambiente e lavadas mais três vezes com água destilada. Adicionalmente, uma lamínula de cada condição foi contra-corada com hematoxilina de Harris por 30 segundos e montadas em meio aquoso. As lamínulas não contra-coradas foram utilizadas para tirar, em média, 30 fotos em campos diferentes de cada lamínula em aumento de 40x, e posteriormente as imagens foram mensuradas quanto a porcentagem de corpos lipídicos por área na célula, utilizando o programa ImageJ versão 1.50i. Os dados foram analisados como (%) área de LDs em cada condição em relação à média dos controles (100% de LDs por área na célula). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

4.7. Quantificação de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas ou não com inibidores de COX-2

Células BeWo e HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas redondas (13 mm) na proporção de 5×10^4 a cada 200µl, durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, taquizoítas de *T. gondii* foram adicionados ou não nas placas na proporção de 1:1 sem adição de SFB durante 3 horas a 37° C e 5% de CO₂. As células foram lavadas para retirada de parasitos extracelulares e tratadas com Meloxicam (10µg/mL e 250 µg/mL) ou Celecoxibe (1 µg/mL e 5 µg/mL) por adicionais 24 horas. Após 24 horas de infecção e tratamento, as células foram processadas para análise da quantidade de corpos lipídicos, como descrito anteriormente. Células não infectadas e não tratadas ou infectadas e não tratadas foram usadas como condição controle. Este experimento tem por objetivo avaliar a formação de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas e não infectadas por *T. gondii* na presença ou ausência de inibição de COX-2. Os dados foram analisados como (%) área de LDs em cada condição em relação à média dos controles (100% de LDs por área na célula). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

4.8. Análise estatística

Os dados foram analisados como média e erro padrão da média usando o programa *GraphPad Prisma* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA*) pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni ou teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Os tratamentos com inibidores de COX-2 não alteram a viabilidade celular em células BeWo e HTR-8/SVneo

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de avaliar a possível citotoxicidade de Meloxicam e Celecoxibe nas diferentes concentrações testadas em células BeWo e HTR-8/SVneo (Fig. 1)

Células BeWo e HTR-8/SVneo foram tratadas com diferentes concentrações de Meloxicam (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL) ou Celecoxibe (1 µg/mL e 5 µg/mL). Após 24 horas, nós observamos que os inibidores de COX-2 não alteraram a viabilidade celular em nenhuma concentração quando comparado com as células não tratadas (meio) ($P < 0,05$), independentemente do tipo celular (Fig. 1A-B). Além disso, nós observamos que o diluente do Celecoxibe, o DMSO, também não foi capaz de diminuir a viabilidade em ambas as células em relação as células não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 1A-B).

Baseado nesses resultados, nós escolhemos duas concentrações de cada inibidor para a realização dos experimentos posteriores, sendo uma de baixa concentração e outra de alta concentração. Para o Meloxicam, foram escolhidas as concentrações de 10 µg/mL e 250 µg/mL, enquanto que para o Celecoxibe as concentrações foram mantidas (1 µg/mL e 5 µg/mL).

5.2. Inibidores de COX-2 reduzem a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo

O ensaio de β -galactosidase foi realizado com o objetivo de avaliar o índice de proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe (Fig. 2).

Células BeWo e HTR-8/SVneo foram infectadas com *T. gondii*, e após 3 horas foram tratadas com Meloxicam (10 µg/mL e 250 µg/mL) ou Celecoxibe (1 µg/mL e 5 µg/mL). Após 24 horas, nós observamos que o tratamento com Meloxicam ou Celecoxibe apresentaram uma significativa redução na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo (Fig. 2A) e HTR-8/SVneo (Fig. 2B) quando comparadas com as células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$). Além disso, nossos resultados apresentaram diferença significativa entre as concentrações utilizadas de Meloxicam ou Celecoxibe, mostrando que a inibição ocorreu de forma dose-dependente ($P < 0,05$) (Fig. 2A-B).

Fotomicrografias representativas de células BeWo (Fig. 2C-G) e HTR-8/SVneo (Fig. 2H-L) são evidenciadas, onde é possível observar um grande número de taquizoítas em células infectadas e não tratadas (C e H) em relação as células infectadas e tratadas com Meloxicam

10µg/mL (D e I), 250µg/mL (E e J) ou tratadas com Celecoxibe 1µg/mL (F e K) e 5µg/mL (G e L).

Portanto, a inibição da enzima COX-2 utilizando Meloxicam ou Celecoxibe favoreceu o controle da infecção por *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo.

5.3. Inibidores de COX-2 induzem maior secreção de IL-6 e MIF e diminuem a produção de IL-4 e IL-10 em células BeWo infectadas por *T. gondii*

Após verificar a diminuição da proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo tratadas com Meloxicam (10 µg/mL e 250 µg/mL) ou Celecoxibe (1 µg/mL e 5 µg/mL), foi realizado o teste de ELISA com o sobrenadante das células BeWo (Fig. 3) para verificar se os inibidores foram capazes de alterar o perfil de citocinas produzidas em células não infectadas e tratadas (Fig. 3A-D), e em células infectadas e tratadas (Fig. 3E-H).

Nós observamos que em células BeWo não infectadas e tratadas com Meloxicam houve um aumento da produção de MIF em relação a células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 3A). Além disso, nós observamos um aumento da produção de MIF em células infectadas e não tratadas ou infectadas e tratadas com ambos inibidores em relação a células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 3E). No entanto, apenas a concentração de 5 µg/mL do Celecoxibe aumentou a produção de MIF quando comparado às células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 3E). Além disso, maiores concentrações de Meloxicam (250 µg/mL) ou Celecoxibe (5 µg/mL) induziram maior secreção de MIF se comparado com as menores concentrações de Meloxicam (10 µg/mL) ou Celecoxibe (1 µg/mL) em células BeWo infectadas ($P < 0,05$), mostrando, portanto, um efeito dose-dependente (Fig. 3E).

Em relação a produção de IL-6, nós observamos que as maiores concentrações dos inibidores foram capazes de aumentar a produção dessa citocina em células somente tratadas em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 3B). Em adição, maior concentração de Meloxicam (250 µg/mL) ou Celecoxibe (5 µg/mL) induziu maior secreção de IL-6 se comparado com a menor concentração de Meloxicam (10 µg/mL) ou Celecoxibe (1 µg/mL) em células BeWo não infectadas ($P < 0,05$), mostrando novamente um efeito dose-dependente (Fig. 3B). Quando as células BeWo foram somente infectadas ou infectadas e tratadas com inibidores de COX-2, independente da concentração, houve um aumento na produção dessa citocina em relação a células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$). Além disso, observamos um aumento na produção de IL-6 em células infectadas e tratadas com as maiores concentrações dos inibidores em relação as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 3F). Em adição, a produção aumentada de IL-6 por células BeWo

infectadas por *T. gondii* e tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe é dose-dependente, uma vez que maiores concentrações de inibidores gatilharam maior secreção de IL-6 ($P < 0,05$) (Fig. 3F).

Em relação a produção de IL-4, nós observamos que células não infectadas e tratadas com a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ de Meloxicam aumentaram a sua produção em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 3C). Quando nós infectamos e tratamos com inibidores de COX-2, observamos baixos níveis de IL-4 apenas em tratamentos com Celecoxibe quando comparado as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 3G).

Em relação a produção de IL-10, nós observamos que células não infectadas e tratadas com Meloxicam, independente da concentração, aumentaram a produção de IL-10 quando comparado com as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 3D). Entretanto, células não infectadas e tratadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de Celecoxibe não alteraram a produção de IL-10 em relação a células não tratadas e não infectadas (meio), e interessantemente não houve níveis detectáveis de IL-10 em células BeWo tratadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de Celecoxibe (Fig. 3D). Quando as células foram infectadas e não tratadas, nós observamos um aumento na produção dessa citocina em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$). No entanto, a inibição de COX-2 com 250 $\mu\text{g/mL}$ de Meloxicam ou 1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ de Celecoxibe foi capaz de diminuir a produção dessa citocina em relação as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 3H).

As citocinas IL-8, TGF- β 1 e TNF- α apresentaram valores abaixo dos níveis de detecção em todas as condições testadas (dados não mostrados).

5.4. Inibidores de COX-2 induzem maior secreção de IL-6 e diminuem a produção de IL-4 e TGF- β 1 em células HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii*

Após verificar a diminuição da proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo tratadas com Meloxicam (10 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$) ou Celecoxibe (1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$), foi realizado o teste de ELISA com o sobrenadante das células HTR-8/SVneo (Fig. 4) para verificar se os inibidores foram capazes de alterar o perfil de citocinas produzidas em células não infectadas e tratadas (Fig. 4A-D), e em células infectadas e tratadas (Fig. 4E-H).

Nas células HTR-8/SVneo, nós observamos que células não infectadas e tratadas com qualquer inibidor, independente da concentração, foram capazes de aumentar a produção de MIF em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 4A). Quando as células HTR-8/SVneo foram apenas infectadas, ou infectadas e tratadas com inibidores de

COX-2, observou-se um aumento na produção dessa citocina quando comparado as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$), exceto na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Meloxicam, em que houve redução de MIF em relação as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 4E).

Em relação a produção de IL-6, nós observamos que células não infectadas e tratadas com as maiores concentrações dos inibidores foram capazes de aumentar a produção em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 4B). Além do mais, maiores concentrações de Celecoxibe induzem maior secreção de IL-6 se comparado a menor concentração de Celecoxibe em células HTR-8/SVneo não infectadas ($P < 0,05$) (Fig. 4B). Células somente infectadas não induziu um aumento na produção de IL-6 em relação as células não infectadas e não tratadas (Fig. 4F). Quando as células foram infectadas e tratadas com ambas concentrações de Meloxicam e a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ do Celecoxibe, houve aumento na produção de IL-6 em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 4F). Além disso, as células infectadas e tratadas com as maiores concentrações dos inibidores de COX-2 aumentaram a produção de IL-6 em relação as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 4F). Além do mais, maiores concentrações de Celecoxibe induzem maior secreção de IL-6 se comparado a menor concentração de Celecoxibe em células HTR-8/SVneo infectadas ($P < 0,05$) (Fig. 4F).

Em relação a produção de IL-4, nós observamos que as células não infectadas e tratadas com ambas concentrações do Meloxicam e com 1 $\mu\text{g/mL}$ do Celecoxibe foram capazes de aumentar a produção dessa citocina em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 4C). Quando nós somente infectamos, observamos um aumento da produção dessa citocina em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$). No entanto, quando nós infectamos e tratamos com qualquer inibidor de COX-2, independente da concentração, observamos diminuição na produção de IL-4 em relação as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 4G).

Em relação a produção de TGF- β 1, nós observamos que células não infectadas e tratadas com ambas concentrações de Meloxicam foram capazes de aumentar a produção dessa citocina em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$) (Fig. 4D). Além disso, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Meloxicam induziu maior secreção de TGF- β 1 se comparado com a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Quando nós somente infectamos, ou infectamos e tratamos com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Meloxicam e 5 $\mu\text{g/mL}$ de Celecoxibe, observamos um aumento na produção de TGF- β 1 em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($P < 0,05$). No entanto, quando nós infectamos e tratamos com ambas concentrações de Meloxicam ou Celecoxibe,

houve uma significativa redução na produção de TGF- β 1 em relação as células somente infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 4H). Em adição, a redução de TGF- β 1 em células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com Meloxicam é dose-dependente, desde que maior concentração deste inibidor de COX induz menor produção desta citocina ($P < 0,05$) (Fig. 4H).

As citocinas IL-8, IL-10 e TNF- α apresentaram valores abaixo dos níveis de detecção em todas as condições testadas (dados não mostrados).

5.5. A quantidade de corpos lipídicos aumenta com o tempo de infecção em células BeWo e HTR-8/SVneo

Após avaliar a carga parasitária e a resposta imune em células trofoblásticas humanas BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas ou não com inibidores de COX-2, nós buscamos investigar se a inibição de COX-2 poderia interferir também na formação de LDs nestas células, desde que estas organelas são fonte de nutrientes para o parasito e, ao mesmo tempo, são locais de armazenamento e produção de mediadores lipídicos importantes na resposta imune a patógenos, como COX-2 e PGE₂ (D'AVILA et al., 2011; GOMES et al., 2014).

Neste sentido, primeiramente avaliamos a quantidade de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo mediante apenas infecção por *T. gondii* por 6 e 24 horas e em seguida foi realizado a coloração de LDs nas células (Fig. 5).

Nós observamos um aumento de LDs em células BeWo (Fig. 5A) e HTR-8/SVneo (Fig. 5B) infectadas por 24 horas se comparadas com as células não infectadas (meio) ($P < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa na quantidade de LDs quando as células foram infectadas por 6 horas se comparado com as células não infectadas (meio).

Fotomicrografias representativas de LDs são evidenciadas em células BeWo (Fig. 5C-F) e HTR-8/SVneo (Fig. 5G-J) não infectadas por 6 horas (C e F) infectadas por 6 horas (D e H) ou não infectadas por 24 horas (E e I) e infectadas por 24 horas (F e J), onde é possível observar um aumento na quantidade de LDs de acordo com o tempo da infecção.

Portanto, a infecção por *T. gondii* induz a formação de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo. Baseado nesses resultados, nós escolhemos o tempo de 24 horas de infecção para avaliação de corpos lipídicos em experimentos posteriores.

5.6. A adição de SFB aumenta a quantidade de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo

Estudos prévios demonstraram que macrófagos peritoneais murinos aumentaram a formação de LDs na presença de soro fetal bovino (MOTA et al., 2014). Assim, com o objetivo de avaliar o efeito do SFB na quantidade de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo, as células foram infectadas ou não por *T. gondii* por 24 horas na presença ou ausência de SFB e em seguida foi realizado a coloração de LDs nas células (Fig. 6).

Conforme já observado na figura anterior (Fig. 5), nós observamos que a infecção por *T. gondii* aumentou a quantidade de LDs em células BeWo (Fig. 6A) e HTR-8/SVneo (Fig. 6B) se comparado com as células não infectadas (meio), independentemente da adição ou não de SFB ($P < 0,05$). Além disso, observamos que a adição de SFB nas células infectadas ou não por *T. gondii* foi capaz de aumentar a quantidade de corpos lipídicos em relação as células infectadas ou não e sem adição de SFB ($P < 0,05$) (Fig. 6A-B).

Fotomicrografias representativas de LDs são evidenciadas em células BeWo (Fig. 6C-F) e HTR-8/SVneo (Fig. 6G-J) não infectadas sem adição de SFB (C e G) infectadas sem adição de SFB (D e H) ou não infectadas com adição de SFB (E e I) e infectadas com adição de SFB (F e J), onde é possível observar um aumento na quantidade de LDs com a adição de SFB.

Portanto, a adição de SFB induz a produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo. Baseado nesses resultados, nós retiramos o SFB a partir do momento da infecção para realização dos experimentos posteriores.

5.7. A quantidade de corpos lipídicos diminui em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com inibidores de COX-2

Após verificar que inibidores de COX-2 diminuem o número de taquizoítas de *T. gondii*, aumentam a resposta imune pró-inflamatória em células BeWo e HTR-8/SVneo, e que *T. gondii* induz a formação de LDs nessas células, nosso objetivo foi avaliar o efeito desses inibidores na produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas (Fig. 7).

Nas células BeWo, nós observamos que células somente infectadas, ou infectadas e tratadas com 10 µg/mL de Meloxicam ou 5 µg/mL de Celecoxibe induziram um aumento de LDs em relação as células não infectadas (meio) ($P < 0,05$). Entretanto, nós observamos que células infectadas e tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe, independente das concentrações, foram capazes de diminuir LDs em relação as células somente infectadas, onde as concentrações de 250 µg/mL de Meloxicam e 1 µg/mL de Celecoxibe tiveram um efeito mais significativo (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 7A).

Nas células HTR-8/SVneo, nós observamos que células somente infectadas, ou infectadas e tratadas com 250 µg/mL de Meloxicam ou ambas concentrações de Celecoxibe induziram um aumento de LDs em relação as células não infectadas (meio) ($P < 0,05$). Entretanto, nós observamos que células infectadas e tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe, independente das concentrações, foram capazes de diminuir LDs em relação as células somente infectadas, onde as menores concentrações de ambos inibidores tiveram um efeito mais significativo (*T. gondii*) ($P < 0,05$) (Fig. 7B).

Fotomicrografias representativas de LDs são evidenciados em células BeWo (Fig. 7C-H) e HTR-8/Svneo (Fig. 7I-N) não infectadas e não tratadas (C e I), infectadas e não tratadas (D e J), infectadas e tratadas com Meloxicam 10µg/mL (E e K), 250µg/mL (F e L) ou tratadas com Celecoxibe 1µg/mL (G e M) e 5µg/mL (H e N), onde nós observamos uma diminuição de LDs nas células infectadas e tratadas em relação as células somente infectadas.

Portanto, a infecção seguida de tratamento com inibidores de COX-2 foram capazes de diminuir a quantidade de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo.

6. DISCUSSÃO

A infecção por muitos patógenos induz a produção de mediadores inflamatórios, como COX e PGE₂. Esses mediadores vêm sendo mostrados como potentes inibidores da resposta Th1 do hospedeiro, levando a uma baixa produção de óxido nítrico, permitindo a sobrevivência e o crescimento de patógenos (MELO et al., 2011b; GOMES et al., 2014). As duas isoformas de ciclooxigenase, COX-1 e COX-2, podem ser inibidas por drogas, o que ocasiona na diminuição na produção de PGE₂. Estudos mostraram que a inibição de COX pela aspirina (AAS) foi capaz de aumentar a produção de IL-1β e óxido nítrico, reduzindo a quantidade de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (MALVEZI et al., 2014).

Esses mediadores inflamatórios são produzidos em LDs, e recentemente muitos trabalhos vem mostrando que diversos patógenos são capazes de aumentar a produção dessas organelas como parte de um mecanismo de evasão do parasito (MELO; DVORAK, 2012). Nesse sentido, estudos mostraram que a infecção por *T. cruzi* induz a formação de LDs em macrófagos, e este evento está diretamente relacionado à síntese de PGE₂ por macrófagos (MELO et al., 2003; D'AVILLA et al., 2011). Além disso, Melo e colaboradores (2003) mostraram que a COX-2 estava co-localizada nos LDs em macrófagos infectados, mostrando a importância dessas organelas como locais de produção de mediadores inflamatórios. No entanto, o papel de COX-2 em infecções por *T. gondii*, assim como sua importância na produção de LDs não é bem elucidado. Desta forma, nesse trabalho nós avaliamos o papel funcional da

COX-2 durante a infecção causada por *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) e seu efeito na formação de corpos lipídicos em células BeWo e HTR-8/SVneo.

Inicialmente, nós verificamos o efeito dos inibidores de COX-2 (Meloxicam e Celecoxibe) em células BeWo e HTR-8/SVneo. Nós observamos que nenhuma concentração utilizada de ambos inibidores foi capaz de diminuir a viabilidade nas duas linhagens celulares. Esses resultados estão de acordo com um estudo prévio do nosso grupo, onde Meloxicam e Celecoxibe não reduziram a viabilidade de macrófagos peritoneais de *Calomys callosus* (PEREIRA, 2016). Em outro estudo utilizando aspirina como inibidor de COX, eles observaram que as concentrações testadas também não foram capazes de diminuir a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (MALVEZI et al., 2014).

Após verificarmos que os inibidores não diminuíram a viabilidade das células, nós avaliamos a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas ou não com inibidores de COX-2. Nossos resultados demonstraram que ambos inibidores foram capazes de diminuir o parasitismo nas duas linhagens celulares de maneira dose-dependente, sugerindo que a susceptibilidade a infecção por *T. gondii* é modulada por COX-2 em células BeWo e HTR-8/SVneo. Esse efeito da inibição e consequente diminuição de *T. gondii* provavelmente esteja relacionado a diminuição de PGE₂. Nossos resultados corroboram com outros estudos, onde a proliferação de *Leishmania* em macrófagos murinos diminuiu quando a COX-2 foi inibida (BARRETO-DE-SOUZA et al., 2006). Em adição, camundongos infectados por *T. cruzi* tiveram menor carga parasitária no miocárdio quando tratados com inibidores de COX-2 (Meloxicam, Etoricoxibe, Aspirina ou Celecoxibe) (MICHELIN et al., 2005; ABDALLA et al., 2008; TATAKIHARA et al., 2008). Inibidores de COX-2 também reduziram a invasão de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais e, simultaneamente, aumentaram a produção de IL-1 β e nitrito, demonstrando o potencial papel de COX-2 em favorecer a infecção por *T. cruzi* por modular negativamente mediadores pró-inflamatórios (MALVEZI et al., 2014). Um estudo recentemente publicado mostrou que Celecoxibe inibiu significativamente a infecção por *T. cruzi* em células mononucleares de sangue periférico, mas a Aspirina, um inibidor de COX-1 e COX-2, não apresentou os mesmos resultados (LONIEN et al., 2017). O efeito de Celecoxibe em reduzir a invasão de *T. cruzi* nestas células foi dose-dependente (LONIEN et al., 2017), o que vai de encontro com nossos resultados em células BeWo e HTR-8/SVneo. Estudos prévios também demonstraram associação de PGE₂/COX-2 e susceptibilidade a *Leishmania*. Células fagocíticas murinas derivadas de células B-1 tratadas com inibidor de COX-2 e infectada com *L. major* mostraram menor número de amastigotas intracelulares e reduzida produção de PGE₂ e IL-10 (ARCANJO et al., 2015), e macrófagos infectados com *L.*

donovani induziram expressão de COX-2 em um modo dependente de TLR2, favorecendo a infecção nestes tipos celulares (BHATTACHARJEE et al., 2016). Portanto, está claro que COX-2 e PGE₂ podem favorecer a persistência de *T. cruzi* e *Leishmania* no hospedeiro. Além disso, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a inibição da COX-2 também diminuiu a quantidade de *T. gondii* em macrófagos peritoneais e em cérebro de *Calomys callosus* (PEREIRA, 2016). Dessa forma, nosso presente estudo é o primeiro a demonstrar o efeito de COX-2 na infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas e extravilosas, ao mostrar o efeito benéfico de COX-2 no crescimento do parasito nestes tipos celulares, uma vez que a inibição de COX-2 foi capaz de controlar o número de taquizoítas.

Posteriormente, nós avaliamos a produção de citocinas em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não e tratadas ou não com inibidores de COX-2. Em células BeWo, nós verificamos que Meloxicam e Celecoxibe foram capazes de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e MIF, e diminuir a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10. Nas células HTR-8/SVneo, nós verificamos que Meloxicam e Celecoxibe também foram capazes de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e MIF, e diminuir a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e TGF- β 1. Estudos demonstraram que a PGE₂ pode inibir a resposta imune do tipo Th1, reduzindo a produção de TNF- α e NO. Portanto, a inibição de COX-2 e, conseqüentemente, de PGE₂, poderia restabelecer o perfil Th1 com a produção de IL-12, IFN- γ e NO (FREIRE DE LIMA et al., 2000).

Estudos relacionam a IL-6 como uma citocina pró-inflamatória devido seu papel protetor contra patógenos, como *T. gondii*. Estudos do nosso grupo mostraram que o tratamento com IL-6 recombinante em células THP-1 e BeWo foi capaz de controlar infecção por *T. gondii* (CASTRO et al., 2013, BARBOSA et al., 2015). MIF é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune inata e adaptativa (CALANDRA et al., 1995; KIM et al., 2007), e muitos estudos demonstram seu papel protetor na infecção por *T. gondii* (FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2011; BARBOSA et al., 2014; DA SILVA et al., 2017, GOMES et al., 2018).

IL-4, IL-10 e TGF- β 1 são citocinas anti-inflamatórias e também são importantes moduladores da resposta imune inata e adaptativa (MOORE et al., 2001). Estudos do nosso grupo demonstraram que células BeWo infectadas por *T. gondii* e tratadas com azitromicina ou espiramicina foram capazes de diminuir o parasitismo, e mostraram uma resposta imune com perfil anti-inflamatória, uma vez que ambas as drogas foram capazes de aumentar a produção de IL-4 e IL-10 e diminuiu a produção de IFN- γ (FRANCO et al., 2011). Em outro estudo do nosso grupo, nós demonstramos que células BeWo tratadas com IL-10 e TGF- β 1 aumentou a

proliferação intracelular de *T. gondii*, e quando essas citocinas foram bloqueadas, a célula foi capaz de controlar o parasitismo (BARBOSA et al., 2008). Portanto, a inibição da COX-2 foi capaz de induzir um perfil pró-inflamatório em células BeWo e HTR-8/SVneo ao aumentar citocinas pró-inflamatórias (MIF e IL-6) e reduzir citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β 1), contribuindo significativamente para o controle da infecção. Em adição, a ação de induzir citocinas pró-inflamatórias por inibidores de COX-2 em células BeWo foi dose-dependente, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, porque doses maiores de Meloxicam e Celecoxibe tiveram um efeito mais significativo em reduzir o parasitismo em células BeWo.

Posteriormente, nós avaliamos o efeito da infecção por *T. gondii* na produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo. Nós observamos que células infectadas por 6 horas não aumentaram a quantidade de LDs em relação as células não infectadas, enquanto que a infecção por 24 horas foi capaz de induzir um aumento significativo. Nossos resultados corroboram com outros estudos, onde a infecção por *T. gondii* induziu uma maior formação de corpos lipídicos em células musculares esqueléticas (GOMES et al., 2014). Além disso, nossos resultados mostrando que apenas na infecção por 24 horas foi capaz de aumentar LDs estão de acordo com outro estudo, onde eles demonstraram que o acúmulo de LDs é dependente do tempo de infecção (NOLAN et al., 2017).

Mota e colaboradores (2014) demonstraram que macrófagos peritoneais murinos tratadas com soro de camundongo e soro fetal bovino foram capazes de aumentar a quantidade de LDs, levando a uma maior produção de PGE₂ e uma diminuição de NO, favorecendo o crescimento de *T. gondii*. Nesse sentido, nós avaliamos se a adição de SFB no momento da infecção poderia aumentar a quantidade de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo. Nossos resultados demonstram que a adição do soro também foi capaz de aumentar a quantidade de LDs nas duas linhagens celulares, sugerindo que o SFB tem um efeito aditivo a infecção na produção de LDs.

Em seguida, após verificarmos que a infecção induz a produção de LDs, que a proliferação intracelular de *T. gondii* é modulada por ciclooxigenase, e que COX-2 pode estar presente nos corpos lipídicos, nós avaliamos se a inibição dessa enzima afetaria a quantidade de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas. Nossos resultados mostraram que ambos inibidores foram capazes de diminuir a quantidade de LDs, o que coincidiu com nossos resultados anteriores de proliferação intracelular de *T. gondii*. Esses resultados podem estar relacionados com a diminuição de PGE₂, que favorece o crescimento do parasito. Estudos mostram que a produção de PGE₂ está correlacionada com o aumento de LDs, o que favoreceu

o crescimento de patógenos (MELO et al., 2003; D'AVILA et al., 2006; GOMES et al., 2014; MOTA et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que camundongos C57BL/6 tratados com vesículas extracelulares da cepa Y de *T. cruzi* (EV Y) tiveram parasitismo cardíaco aumentado e elevada internalização do parasita em macrófagos derivados de medula óssea, e estes efeitos foram associados com a formação de corpos lipídicos e produção de PGE₂ (LOVO-MARTINS et al., 2018). Também, o tratamento com as drogas NS-398 e aspirina inibiram PGE₂ e reduziram replicação de *T. cruzi* em macrófagos, evidenciando eicosanoides e corpos lipídicos como mecanismos de escape do parasito (ALMEIDA et al., 2018).

No entanto, o controle do parasitismo não está apenas relacionado com a diminuição de LDs, uma vez que os inibidores também induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias. É interessante notar que as menores concentrações de Meloxicam e Celecoxibe foram mais efetivas em reduzir a formação de corpos lipídicos do que as maiores concentrações, e isto deveria coincidir com os dados de proliferação intracelular de *T. gondii*, visto que nas maiores concentrações de Meloxicam ou Celecoxibe o efeito de controlar o parasitismo foi mais significativo. Entretanto, o efeito dose-dependente de inibidores de COX-2 em controlar a infecção por *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo pode ser explicado pelo efeito dose-dependente dos inibidores em gatilhar uma potente resposta imune pró-inflamatória, refletida pela modulação positiva de IL-6 e MIF. Assim, é possível especular que a resposta imune é mais potente em controlar o parasitismo em células trofoblásticas humanas do que a disponibilidade de corpos lipídicos. Portanto, menores concentrações de inibidores de COX-2 induzem uma menor resposta pró-inflamatória, mas simultaneamente reduzem mais significativamente os corpos lipídicos, contribuindo para o controle do parasitismo. Em contrapartida, maiores concentrações de inibidores de COX-2 induzem maior resposta pró-inflamatória, mas simultaneamente reduzem menos eficientemente os corpos lipídicos, também contribuindo para o controle do parasitismo, porém de modo mais eficiente. Também, é possível que, em maiores doses de inibidores de COX-2 (Meloxicam ou Celecoxibe), por haver menos parasitos devido à alta resposta inflamatória, as células trofoblásticas consigam manter um maior número de corpos lipídicos por haver menos taquizoítas consumidores do conteúdo destas organelas.

Considerando nossos resultados, nós concluímos que COX-2 modula a infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas BeWo e HTR-8/SVneo, uma vez que sua inibição foi capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e MIF, além de reduzir a quantidade de LDs que são fontes de nutrientes para a sua manutenção e replicação. Os resultados até aqui são importantes, pois novas interações entre parasito-hospedeiro na interface

materno-fetal podem ser desvendadas afim de propor novas estratégias terapêuticas para o tratamento da toxoplasmose congênita. No entanto, estudos utilizando modelos *ex vivo* são importantes para entender o real mecanismo desses inibidores na infecção e produção de LDs por *T. gondii*.

7. CONCLUSÃO

- Células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com inibidores de COX-2 (Meloxicam e Celecoxibe) não tiveram sua viabilidade celular alterada.
- Células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas com *T. gondii* e tratadas com inibidores de COX-2 apresentaram uma redução significativa na proliferação intracelular de *T. gondii*.
- Células BeWo infectadas e tratadas com inibidores de COX-2 induziram maior produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e MIF, e diminuíram a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10.
- Células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com inibidores de COX-2 induziram maior produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, e diminuíram a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e TGF- β 1.
- A infecção por *T. gondii* induz a formação de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo e isto é dependente do tempo de infecção.
- A adição de SFB no momento da infecção induz maior formação de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo.
- A infecção por *T. gondii* seguida da inibição de COX-2 diminui a produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo.

8. FIGURAS

Figura 1: Viabilidade celular em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com inibidores de COX-2. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 μ l por poço, respectivamente, por 24 horas. Posteriormente, elas foram tratadas com Meloxicam ou Celecoxibe por mais 24 horas. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de MTT e os dados foram apresentados como (%) de células viáveis (viabilidade celular) em relação as células não tratadas (100% de viabilidade). Foram realizados quatro experimentos independentes em nonoplicata.

Figura 1

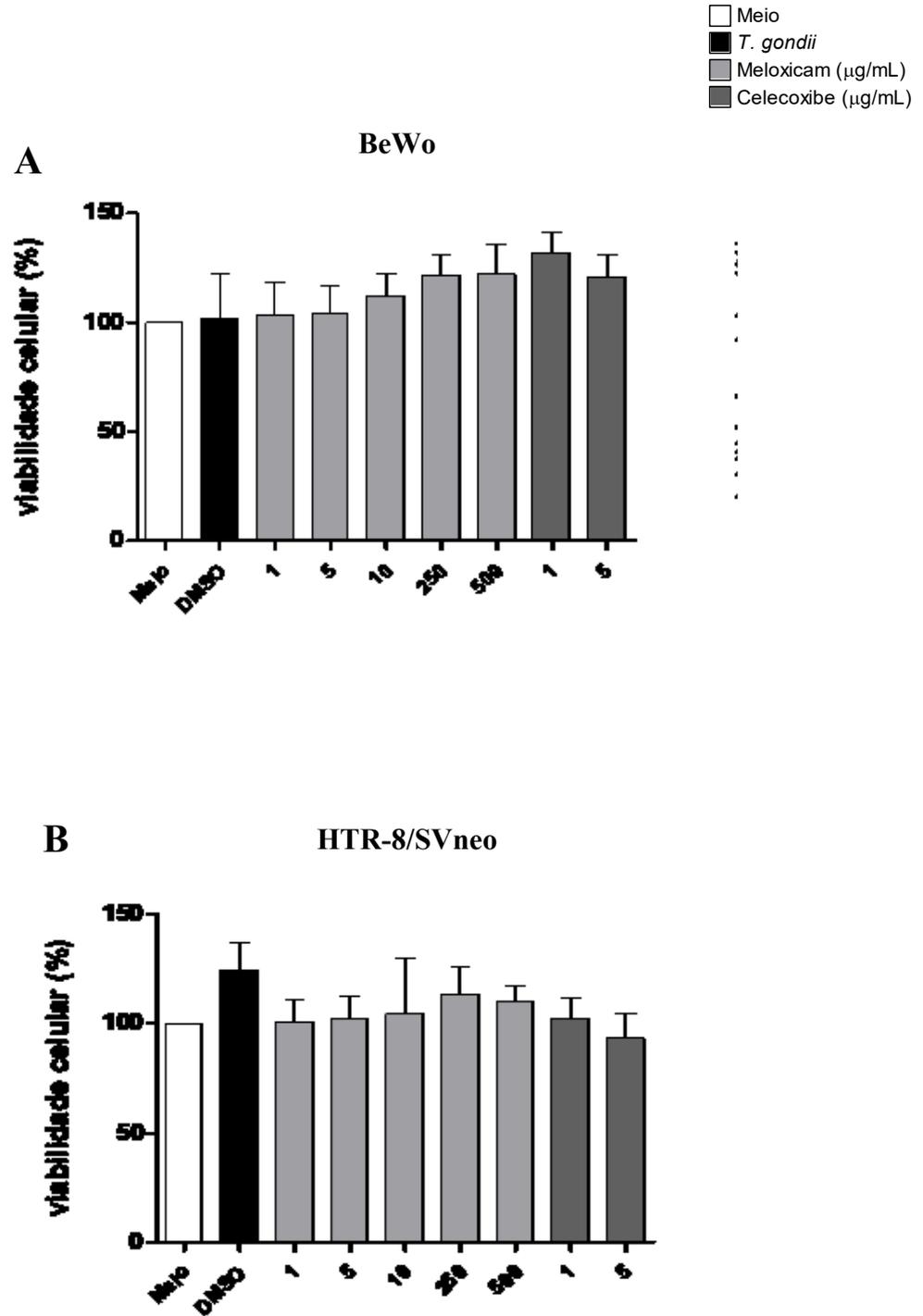


Figura 2: Proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas ou não com inibidores de COX-2. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 μ l por poço, respectivamente, por 24 horas. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* durante 3 horas e tratadas ou não com Meloxicam ou Celecoxibe por mais 24 horas. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (ensaio de β -galactosidase). Os dados obtidos foram analisados quanto ao número de taquizoítas totais em relação a curva padrão de taquizoítas livres. Diferenças significativas em relação a células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($*P < 0.05$), entre as concentrações de Meloxicam ($^{\$}P < 0.05$) e entre as concentrações de Celecoxibe ($^{\%}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Fotomicrografias representativas (aumento de 40 x) de células BeWo (C-G) e HTR-8/SVneo (H-L) infectadas e não tratadas (C e H), ou tratadas com Meloxicam 10 μ g/mL (D e I), 250 μ g/mL (E e J) ou tratadas com Celecoxibe 1 μ g/mL (F e K) e 5 μ g/mL (G e L). Foram realizados quatro experimentos independentes em nonoplicata. Setas indicam parasitos dentro de vacúolos parasitóforos. Barra: 50 ou 200 μ m

Figura 2

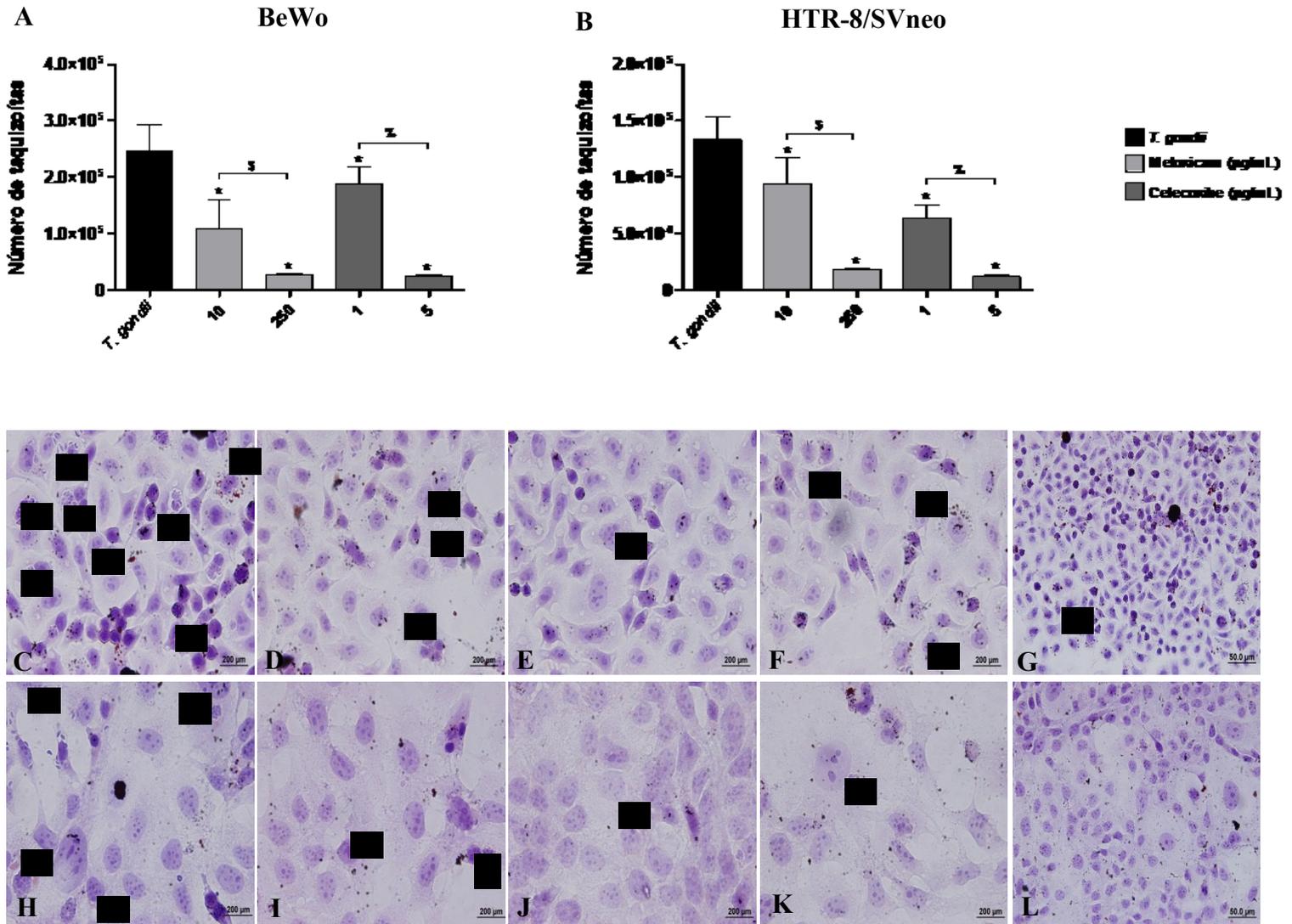


Figura 3: Produção de citocinas em células BeWo infectadas ou não e tratadas ou não com inibidores de COX-2. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 células/200 μ l por poço por 24 horas. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* durante 3 horas ou não infectadas e tratadas ou não com Meloxicam ou Celecoxibe por mais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas por ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Células BeWo não infectadas e tratadas (**A-D**) ou infectadas e tratadas (**E-H**). Diferenças significativas em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($*P < 0.05$), células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($^{\#}P < 0.05$), entre as concentrações de Meloxicam ($^{\$}P < 0.05$) e entre as concentrações de Celecoxibe ($^{\%}P < 0.05$). Diferença entre os grupos foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis com comparações múltiplas de Dunn ou pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Foram realizados três experimentos independentes em nonoplicata.

Figura 3
BeWo

Meio
 T. gondii
 Meloxicam (µg/mL)
 Celecoxibe (µg/mL)

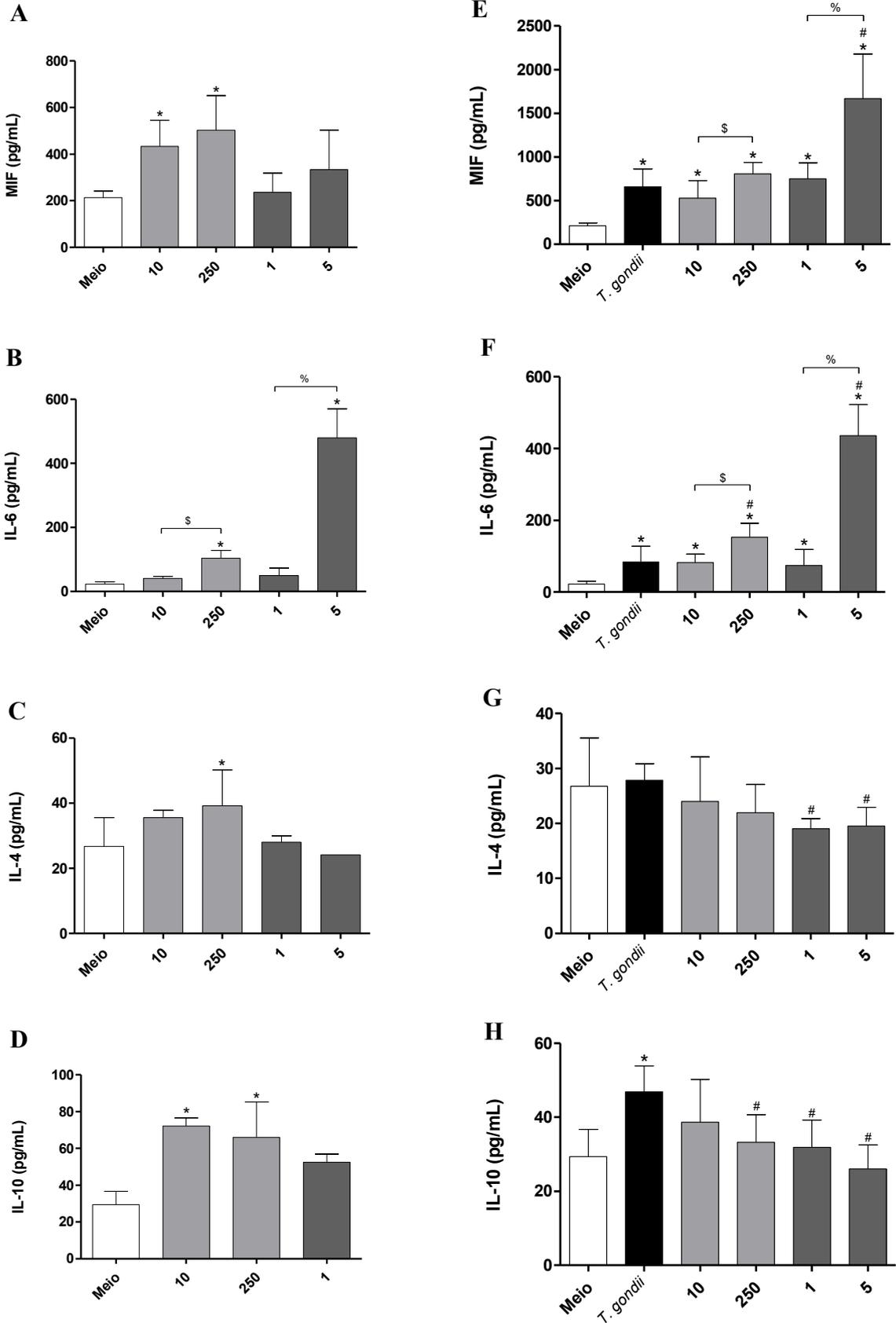


Figura 4: Produção de citocinas em células HTR-8/SVneo infectadas ou não e tratadas ou não com inibidores de COX-2. Células HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 2×10^4 células/200 μ l por poço por 24 horas. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* durante 3 horas ou não e tratadas ou não com Meloxicam ou Celecoxibe por mais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas por ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Células HTR-8/SVneo não infectadas e tratadas (**A-D**) ou infectadas e tratadas (**E-H**). Diferenças significativas em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) (* $P < 0.05$), células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($^{\#}P < 0.05$), entre as concentrações de Meloxicam ($^{\$}P < 0.05$) e entre as concentrações de Celecoxibe ($^{\%}P < 0.05$). Diferença entre os grupos foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis com comparações múltiplas de Dunn ou pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Foram realizados três experimentos independentes em nonoplicata.

Figura 4

HTR-8/SVneo

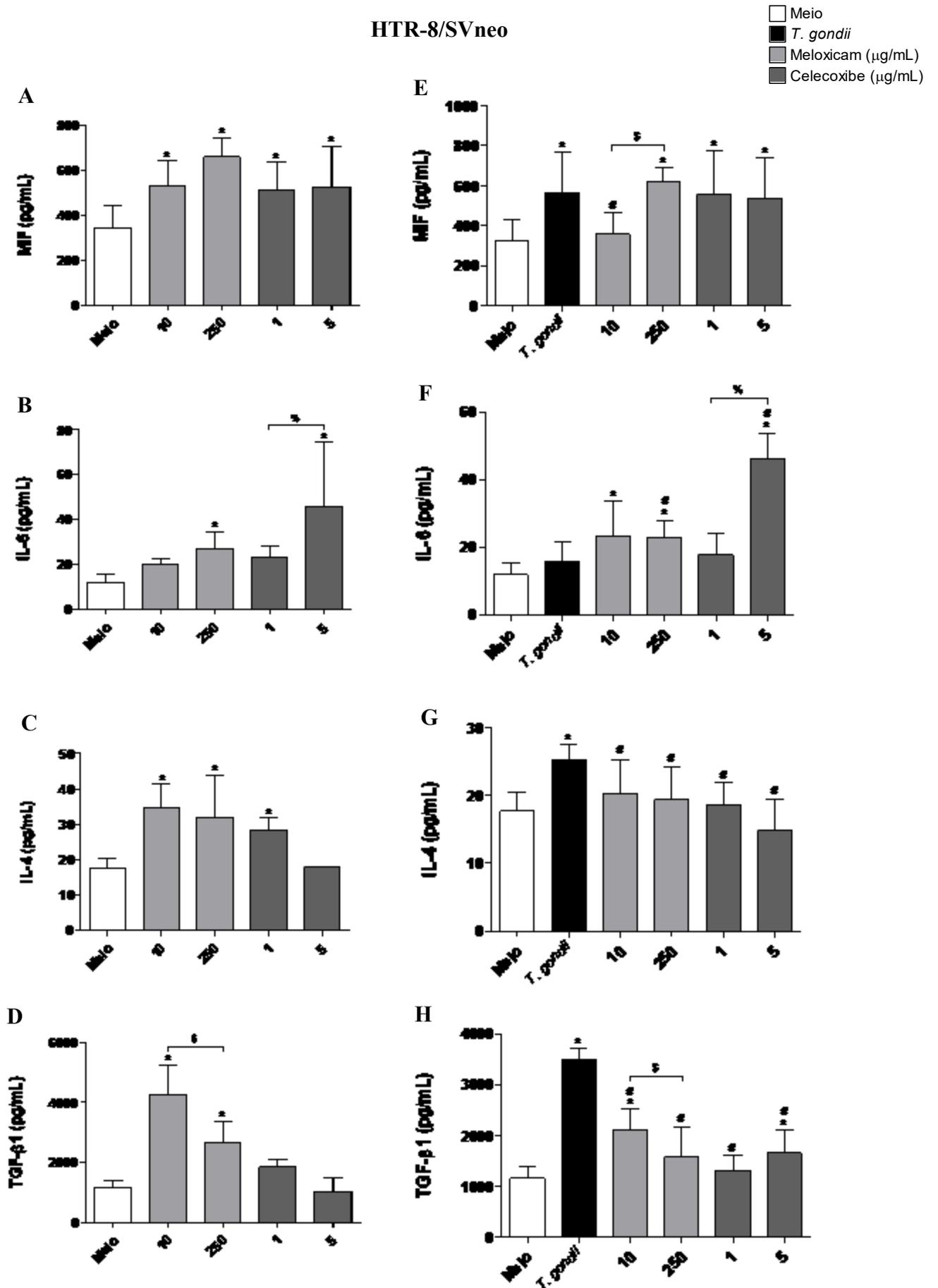


Figura 5: Produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii*. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 24 poços na proporção de 5×10^4 células/200 μ l por poço por 24 horas. Posteriormente, elas foram infectadas ou não durante 6 ou 24 horas. Em seguida, as células foram coradas com Oil red O (0,5 %) para marcação de LDs. Posteriormente, foram tiradas em média 30 fotos em campos diferentes em cada condição, e essas fotos foram analisadas pelo programa Image J. Os resultados foram expressos em % área de LDs em relação à média do controle não infectado por 6 horas (100% de LDs na célula, linha tracejada). Diferenças significativas em relação as células não infectadas (meio) ($*P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Fotomicrografias representativas (aumento de 40 x) de células BeWo (C-F) e HTR-8/SVneo (G-J) não infectadas por 6 horas (C e G), infectadas por 6 horas (D e H) ou não infectadas por 24 horas (E e I) e infectadas por 24 horas (F e J). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata. Coloração com Oil Red O. Barra: 50 μ m

Figura 5

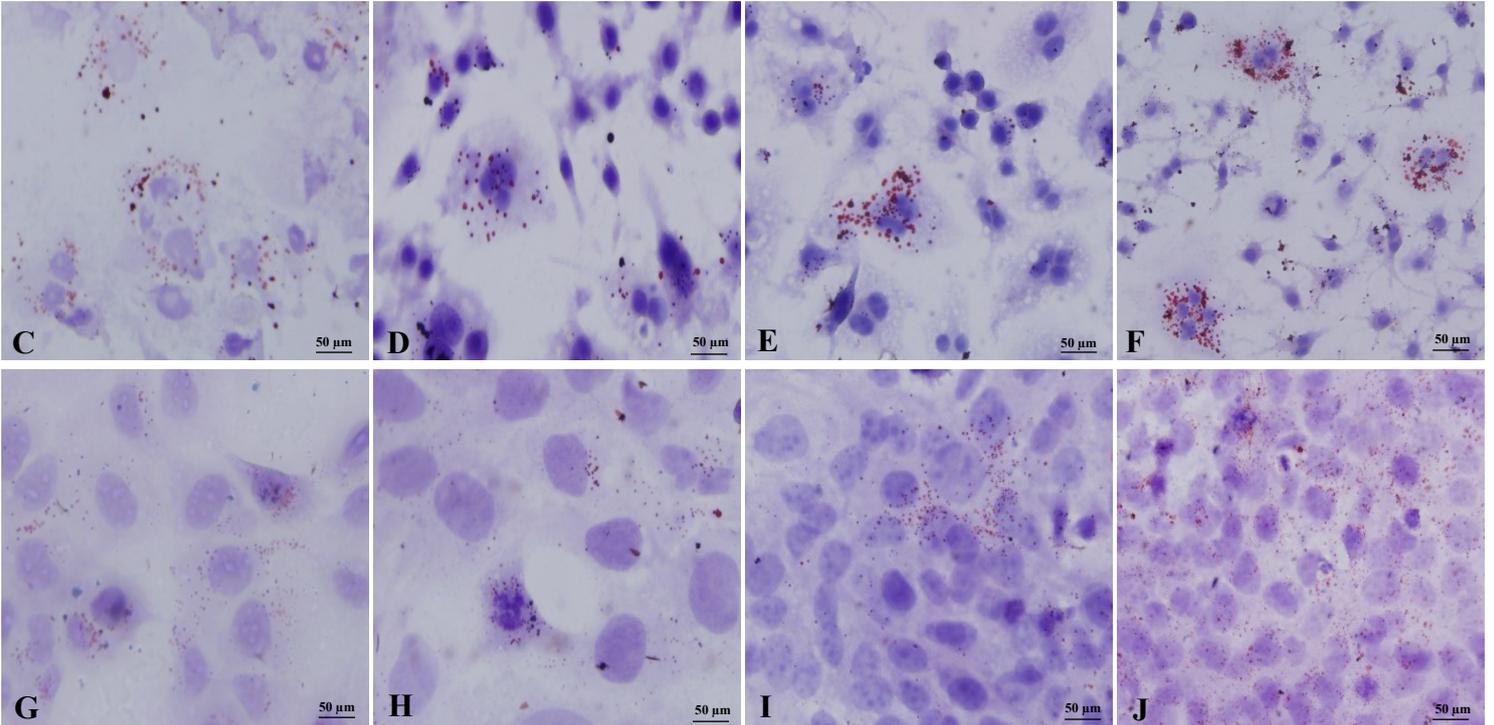
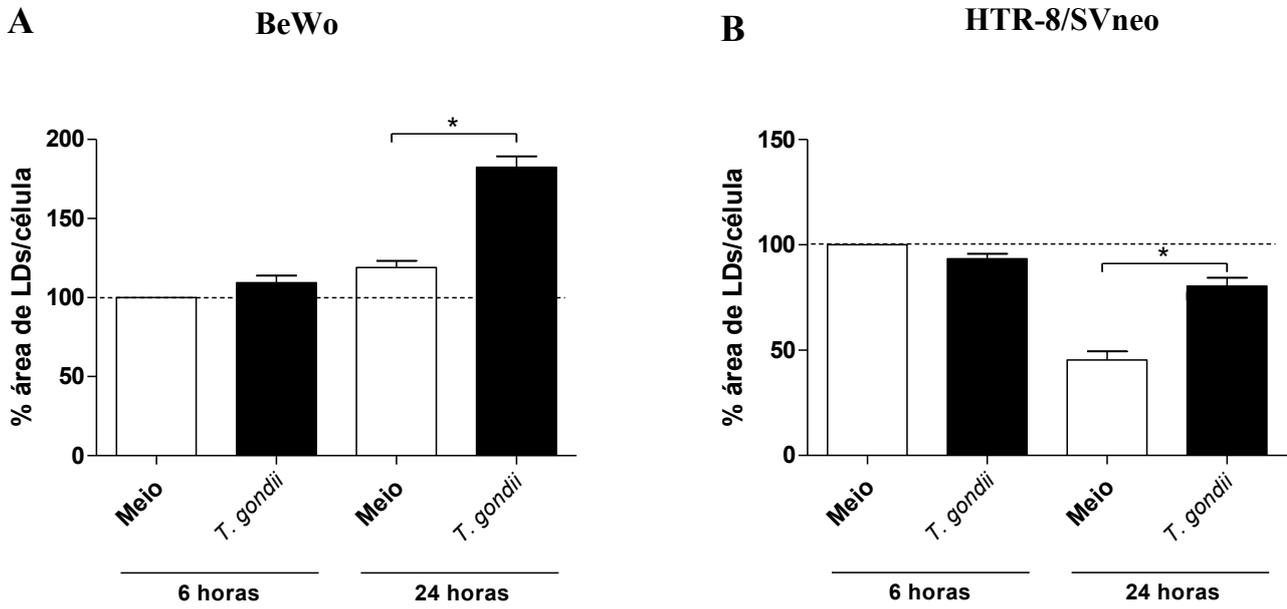
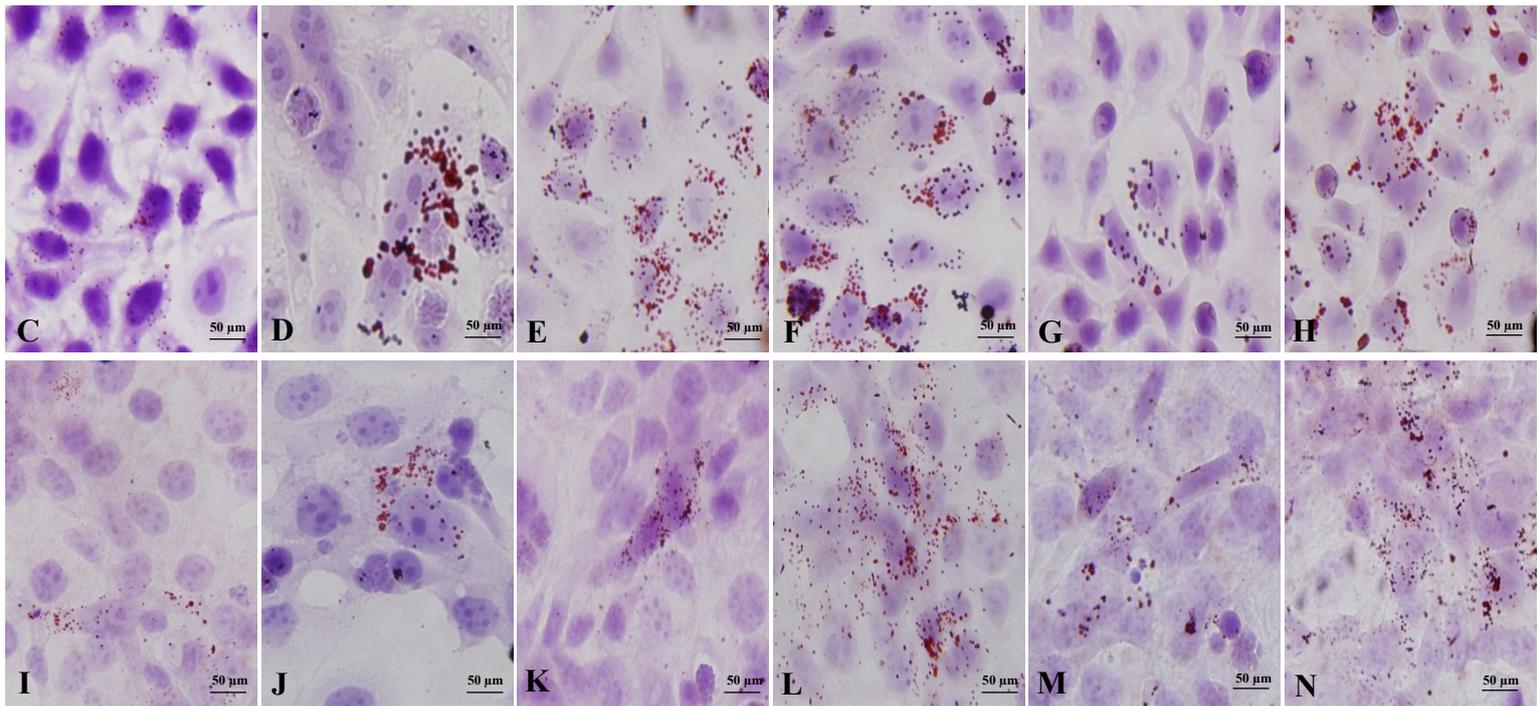
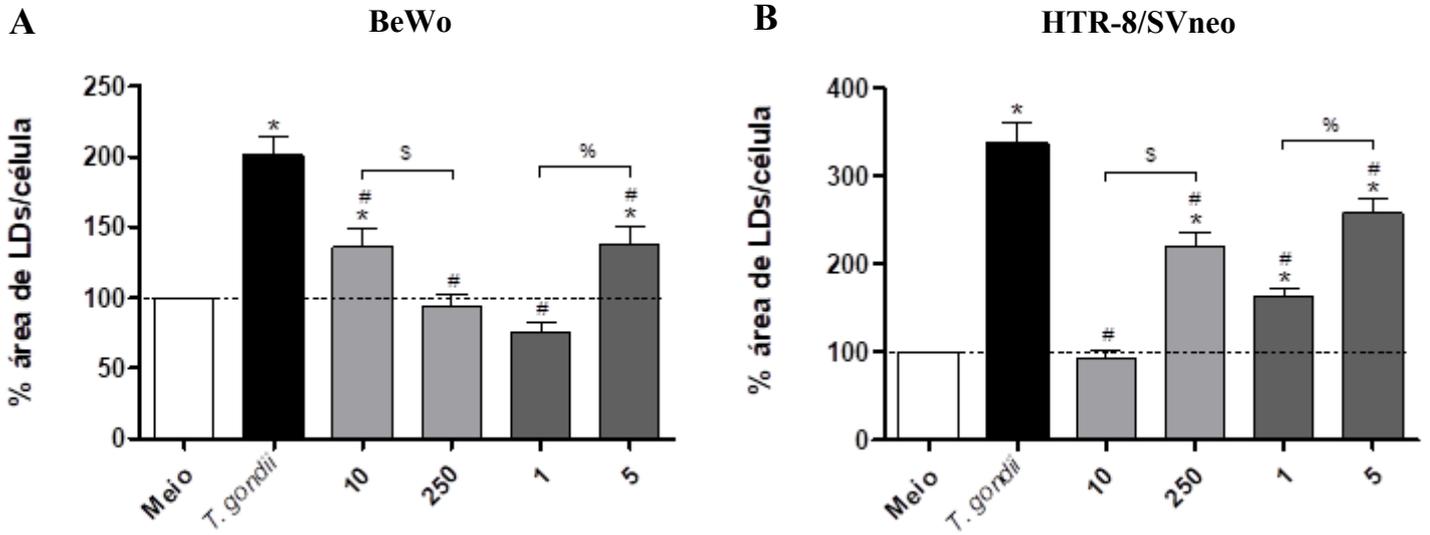
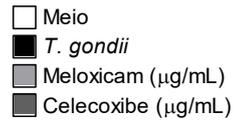


Figura 6: Produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não e com adição ou não de SFB. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 24 poços na proporção de 5×10^4 células/200µl por poço por 24 horas. Posteriormente, elas foram infectadas ou não durante 24 horas com a adição ou não de SFB no meio RPMI. Em seguida, as células foram coradas com Oil red O (0, 5 %) para marcação de LDs. Posteriormente, foram tiradas em média 30 fotos em campos diferentes em cada condição, e essas fotos foram analisadas pelo programa Image J. Os resultados foram expressos em % área de LDs em relação à média do controle não infectado sem adição de SFB (100% de LDs na célula, linha tracejada). Diferenças significativas em relação as células não infectadas (meio) ($*P < 0.05$), entre as células não infectadas (meio) ($^{\$}P < 0.05$), e entre as células infectadas ($^{\%}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Fotomicrografias representativas (aumento de 40 x) de células BeWo (C-F) e HTR-8/SVneo (G-J) não infectadas sem adição de SFB (C e G) infectadas sem adição de SFB (D e H) ou não infectadas com adição de SFB (E e I) e infectadas com adição de SFB (F e J). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata. Coloração com Oil Red O. Barra: 50 µm

Figura 7: Produção de LDs em células BeWo e HTR-8/SVneo infectadas ou não e tratadas ou não com inibidores de COX-2. Células BeWo (**A**) e HTR-8/SVneo (**B**) foram cultivadas em placas de 24 poços na proporção de 5×10^4 células/200 μ l por poço por 24 horas. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* por 3 horas, ou não infectadas, e foram tratadas ou não com inibidores de COX-2 por 24 horas. Em seguida, as células foram coradas com Oil red O (0,5 %) para marcação de LDs. Posteriormente, foram tiradas em média 30 fotos em campos diferentes em cada condição, e essas fotos foram analisadas pelo programa Image J. Os resultados foram expressos em % área de LDs em relação ao controle não infectado e não tratado (100% de LDs na célula, linha tracejada). Diferenças significativas em relação as células não infectadas e não tratadas (meio) ($*P < 0.05$), células infectadas e não tratadas (*T. gondii*) ($^{\#}P < 0.05$), entre as concentrações de Meloxicam ($^{\$}P < 0.05$) e entre as concentrações de Celecoxibe ($^{\%}P < 0.05$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Fotomicrografias representativas (aumento de 40 x) de LDs em células BeWo (**C-H**) e HTR-8/Svneo (**I-N**) não infectadas e não tratadas (**C e I**), infectadas e não tratadas (**D e J**), infectadas e tratadas com Meloxicam 10 μ g/mL (**E e K**), 250 μ g/mL (**F e L**) ou tratadas com Celecoxibe 1 μ g/mL (**G e M**) e 5 μ g/mL (**H e N**). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata. Coloração com Oil Red O. Barra: 50 μ m

Figura 7



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J. Infect Dis.**, v. 188, n. 4, p. 608-616, 2003.

ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E.; SILVA, K. T.; CASTRO, E. C.; REIS, M. A.; MICHELIN, M. A. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE₂ in immune response during the acute phase of experimental infection. **Exp. Parasitol.**, v. 118, n. 4, p. 514-521, 2008.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, M.; CARMÉ, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.

AKBAR, AN., VUKMANOVIC-STEJIC, M.; TAAMS, L.S.; MACALLAN, DC.: The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 231-37, 2007.

ALMEIDA, P. E.; TOLEDO, D. A. M.; RODRIGUES, G. S. C.; D'AVILA, H. Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin E₂ Synthesis During Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 499, p. 1-8, 2018.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; MARTINEZ-MARTINEZ, A. L.; SANCHEZ-ANGUIANO, L. F.; HERNANDEZ-TINOCO, J.; CASTILLO-ORONA, J. M.; SALAS-MARTINEZ, C.; SIFUENTES-ALVAREZ, A.; SANDOVAL-CARRILLO, A. A.; SALAS-PACHECO, J. M.; LIENSEFELD, O.; ANTUNA-SALCIDO, E. L. Lack of association between *Toxoplasma gondii* exposure and depression in pregnant women: a case-control study. **BMC Infect Dis.**, v. 17, n. 190, p. 1-4, 2017.

APLIN, J. D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. **J. Cell. Sci.**, v. 99, n. 4, p. 681-692, 1991.

ARCANJO, A. F.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.ROCHA, J. D.; ZAMITH, D.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; NUNES, M. P.; MESQUITA-SANTOS, F. P.; MORROT, A.; FILARDY, A. A.; MARIANO, M.; BANDEIRA-MELO, C.; DOS REIS, G. A.; DECOTE-RICARDO, D.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. The PGE₂/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* Infection. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-18, 2015.

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- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clin Exp Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008.

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, n. 3, p. 152-162, 2014.

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. **Biol Reprod.**, v. 92, n. 3, 2015.

BARRETO-DE-SOUZA, V.; PACHECO, G. J.; SILVA, A. R.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.; SARAIVA, E. M.; BOU-HABIB, D. C. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ synthesis. **J Infect Dis.**, v. 194, n. 6, p. 846-854, 2006.

BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B.; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. **J Lipid Res.**, v. 48, n. 4, p. 837-847, 2007.

BHATTACHARJEE, A.; MAJUMDER, S.; DAS, S.; GHOSH, S.; BISWAS, S.; MAJUMDAR, S. *Leishmania donovani*-Induced Prostaglandin E₂ Generation Is Critically Dependent on Host Toll-Like Receptor 2-Cytosolic Phospholipase A₂ Signaling. **Infect Immun.**, v. 84, n. 10, p. 2963-2973, 2016.

BATLOUNI, M. [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects]. **Arq Bras Cardiol.**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BELLER, M.; THIEL, K.; THUL, P. J.; JACKLE, H. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 11, p. 2176-2182, 2010.

BOLAIS, P.F.; VIGNOLES, P.; PEREIRA, P. F.; KEIM, R.; AROUSSI, A.; ISMAIL, K.; DARDÉ, M. L.; AMENDOEIRA, M. R.; MERCIER, A. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2017.

BOULANT, S.; TARGETT-ADAMS, P.; MCLAUCHLAN, J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. **J Gen Virol.**, v. 88, n. 8, p. 2204-2213, 2007.

BOZZA, P. T.; YU, W.; PENROSE, J. F.; MORGAN, E. S.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J Exp Med.**, v. 186, n. 5, p. 909-920, 1997.

BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 113-120, 2005.

BOZZA, P. T.; MELO, R. C.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacol Ther.**, v. 113, n. 1, p. 30-49, 2007.

BOZZA, P. T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R. A.; BANDEIRA-MELO, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.

BRASAEMLE, D. L.; BARBER, T.; WOLINS, N. E.; SERRERO, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; LONDOS, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. **J Lipid Res.**, v. 38, n. 11, p. 2249-2263, 1997.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. D.; KASPER, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infection. **Cell. Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 535-544, 2006.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; SPIEGEL, L. A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. **Nature**, v. 377, n. 6544, p. 68-71, 1995.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.**, v. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.

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

CHEUNG, W.; GILL, M.; ESPOSITO, A.; KAMINSKI, C. F.; COUROUSSE, N.; CHWETZOFF, S.; TRUGNAN, G.; KESHAVAN, N.; LEVER, A.; DESSELBERGER, U. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. **J Virol.**, v. 84, n. 13, p. 6782-6798, 2010.

COCCHIARO, J. L.; KUMAR, Y.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T.; VALDIVIA, R. H. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 27, p. 9379-9384, 2008.

COPPENS, I.; SINAI, A. P.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. **J Cell Biol.**, v. 143, n. 1, p. 167-180, 2000.

COPPENS, I.; JOINER, K. A. Host but Not Parasite Cholesterol Controls *Toxoplasma* Cell Entry by Modulating Organelle Discharge. **Mol Biol Cell.**, v. 14, n. 9, p. 3804-3820, 2003.

D'AVILA, H.; MELO, R. C.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **J. Immunol.**, v. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJAFIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. **J. Infect Dis.**, v. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.

DA SILVA, R. J.; GOMES, A. O.; FRANCO, P. S.; PEREIRA, A. S.; MILIAN, I. C. B.; RIBEIRO, M.; FIORENZANI, P.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; DA SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V.; DE FREITAS, B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 7, n. 340, p. 1-21, 2017.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M. A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M. G.; MANSUR, D. S.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 179, n. 2, p. 1129-1137, 2007.

DENKERS, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

DING, G. C.; CHEN, M.; WANG, Y. X.; RUI, C.; XU, W.; DING, H. J.; SHI, Z. H. MicroRNA-128a-induced apoptosis in HTR-8/SVneo trophoblast cells contributes to pre-eclampsia. **Biomed Pharmacother.**, v. 81, p. 63-70, 2016.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin Microbiol Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; HOETA, I.; OLARIU, T. T.; JONES, J. L.; DARABUS, G. Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. **Parasitology**, v. 141, n. 3, p. 311-225, 2014.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, 1999.

FARESE, R. V. WALTHER, T. C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. **Cell.**, v. 139, n. 5, p. 855-860, 2009.

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W. M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. **Virchows Archiv A Pathological anatomy and histopathol.**, v. 411, n. 1, p. 39-43, 1987.

FERGUSON, D. J. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **Int J Parasitol.**, v. 34, n. 3, p. 347-360, 2004.

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

FRANCO, P. S.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; GOMES, A. O.; SILVA, A. L.; PENA, J. D.; 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, n. 2, p. 116-120, 2011.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOS REIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, n. 6766, p. 199-203, 2000.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology today**, v. 4, n. 10, p. 273-278, 1988.

GARCIA-MERIC, P.; FRANCK, J.; DUMON, H.; PIARROUX, R. [Management of congenital toxoplasmosis in France: current data]. **Presse Med.**, v. 39, n. 5, p. 530-538, 2010.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 90, n. 13, p. 6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R.; YUHUI, X.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 149, p. 175-180, 1992.

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol.**, v.178, p.2792-2801, 2011.

GOMES, A. F.; MAGALHÃES, K. G.; RODRIGUES, R. M.; DE CARVALHO, L.; MOLINARO, R.; BOZZA, P. T.; BARBOSA, H. S. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE₂. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 47, p. 1-13, 2014.

GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; RIBEIRO, M.; SILVA, R. J.; GOIS, P. S. G.; ALMEIDA, K. C.; ANGELONI, M. B.; CASTRO, A. S.; GUIRELLI, P. M.; CÂNDIDO, J. V.; CHICA, J. E. L.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Prevents Maternal Death, but Contributes to Poor Fetal Outcome During Congenital Toxoplasmosis. **Front Microbiol.**, v. 9, n. 906, p. 1-18, 2018.

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. **Exp Cell Res.**, v. 206, n. 2, p. 204-211, 1993.

GREENBERG, A. S.; EGAN, J. J.; WEK, S. A.; GARTY, N. B.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; LONDOS, C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. **J Biol Chem.**, v. 266, n. 17, p. 11341-11346, 1991.

GUIRELLI, P. M.; ANGELONI, M. B.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; CASTRO, A. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, R. J.; OLIVEIRA, J. G.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, J. R.;

IETTA, F.; FERRO, E. A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 36, n. 10, p. 1106-1114, 2015.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin. Microbiol Infect.**, v. 8, n. 10, p.634-640, 2002.

HOPE, R. G.; MURPHY, D. J.; MCLAUCHLAN, J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 6, p. 4261-4270, 2002.

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

HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, v. 64, n. 12., 5193-5198, 1996.

HU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; FRAUNHOLZ, M.; SURAVAJJALA, S.; DILULLO, C.; YATES, J.; ROOS, D.S.; MURRAY, J. M. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.**, v. 2, n. 2, p. 1-18, 2006.

HU, X.; BINNS, D.; REESE, M. L. The coccidian parasites *Toxoplasma* and *Neospora* dysregulate mammalian lipid droplet biogenesis. **J Biol Chem.**, v. 292, n. 26, p. 11009-11020, 2017.

HUPPERTZ, B.; BORGES, M. Placenta trophoblast fusion. **Methods Mol Biol.**, v. 475, p. 135-147, 2008.

HUPPERTZ, B.; GAUSTER, M. Trophoblast fusion. **Adv Exp Med Biol.**, v. 713, p. 81-95, 2011.

IMAM, A.; AL-ANZI, F. G.; AL-GHASHAM, M. A.; AL-SURAIKH, M. A.; AL-YAHYA, A. O.; RASHEED, Z. Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection among cancer patients. A prospective study from Qassim region, Saudi Arabia. **Saudi Med J.**, v. 38, n. 3, p. 319-321, 2017.

ITABE, H.; YAMAGUCHI, T.; NIMURA, S.; SASABE, N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. **Lipids Health Dis.**, v. 16, n. 83, p. 1-11, 2017.

JONES, J.; LOPES, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **Am Fam Physician**, v. 67, p. 2131-2138, 2003.

KALANTARI, F.; BERGERON, J. J.; NILSSON, T. Biogenesis of lipid droplets--how cells get fatter. **Mol Membr Biol.**, v. 27, n. 8, p. 462-468, 2010.

KIM, H. R.; PARK, M. K.; CHO, M. L.; YOON, C. H.; LEE, S. H.; PARK, S. H.; LENG, L.; BUCALA, R.; KANG, I.; CHOE, J.; KIM, H. Y. Macrophage migration inhibitory factor upregulates angiogenic factors and correlates with clinical measures in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.**, v. 34, n. 5, p. 927-936, 2007.

KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **J Fr Ophtamol.**, v. 33, n. 5, p. 362-367, 2010.

KUMAR, Y.; COCCHIARO, J.; VALDIVIA, R. H. The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. **Curr Biol.**, v. 16, n. 16, p. 1646-1651, 2006.

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

LI, X. L.; WEI, H. X.; ZHANG, H.; PENG, H. J.; LINDSAY, D. S. A meta analysis on risks of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 1-12, 2014.

LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; DUASO, J.; DROGUETT, D.; SANDOVAL, A.; BARAHONA, K.; HERNÁNDEZ, A.; GALANTI, N.; MAYA, J. D.; KEMMERLING, U. *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1035-1042, 2014.

LONIEN, S. C. H.; MALVEZI, A. D.; SUZUKAWA, H. T.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; BORDIGNON, J.; PINGE-FILHO, P. Response to *Trypanosoma cruzi* by Human Blood Cells Enriched with Dendritic Cells Is Controlled by Cyclooxygenase-2 Pathway. **Front Microbiol.**, v. 8, n. 2020, p. 1-11, 2017.

LOVETT, J. L.; MARCHESINI, N.; MORENO, S. N.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 29, p. 25870-25876, 2002.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; ZANLUGUI, N. G.; LUCCHETTI, B. F. C.; TATAKIHARA, V. L. H.; MORKING, P. A.; DE OLIVEIRA, A. G.; GOLDENBERG, S.; WOWK, P. F.; PINGE-FILHO, P. Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE₂ Production in Murine Macrophages. **Front Immunol.**, v. 9, n. 896, p. 1-16, 2018.

MA, X.; CHOW, J. M.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S. F.; DZIALO, R.; TRINCHIERI, G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. **J Exp Med.**, v. 183, n. 1, p. 147-157, 1996.

MALVEZI, A. D.; PANIS, C.; DA SILVA, R. V.; DE FREITAS, R. C.; LOVO-MARTINS, M. I.; TATAKIHARA, V. L. H.; ZANLUQUI, N. G.; NETO, E. C.; GOLDENBERG, S.; BORGIGNON, J.; YAMADA-OGATTA, S. F.; MARTINS-PINGE, M. C.; CECCHINI, R.; PINGE-FILHO, P. Inhibition of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 Impairs *Trypanosoma cruzi* Entry into Cardiac Cells and Promotes Differential Modulation of the Inflammatory Response. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, n. 10, p. 6157-6164, 2014.

MATTOS, K. A.; OLIVEIRA, V. G.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S.; PINHEIRO, R. O.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C.; BOZZA, P. T. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **J Immunol.**, v. 187, n. 5, p. 2548-2558, 2011.

MAYHEW, T. M. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 229-240, 2014.

MCLEOD, R.; BOYER, K.; KARRISON, T.; KASZA, K.; SWISHER, C.; ROIZEN, N.; JALBRZIKOWSKI, J.; REMINGTON, J.; HEYDEMANN, P.; NOBLE, A. G.; METS, M.; HOLFELS, E.; WITHERS, S.; LATKANY, P.; MEIER, P. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. **Clin Infect Dis.**, v. 42, n. 10, p. 1383-1394, 2006.

MCLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 320-344, 2009.

MELO, R. C.; D'AVILA, H.; FABRINO, D. L.; ALMEIDA, P. E.; BOZZA, P. T. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue Cell**, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2003.

- MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEJI, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011a.
- MELO, R. C.; D'AVILA, H.; WAN, H. C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **J Histochem Cytochem.**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011b.
- MELO, R. C.; DVORAK, A. M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? **PloS Pathogen.**, v. 8, n. 7, p. 7-13, 2012.
- MERCIER, C.; ADJOGLE, K. D.; DAUBENER, W.; DELAUW, M. F. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 8, p. 829-849, 2005.
- MEYERS, A.; WEISKITTEL, T. M.; DALHAIMER, P. Lipid Droplets: Formation to Breakdown. **Lipids**, v. 52, n. 6, p. 465-475, 2017.
- MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol.**, v. 111, n. 2, p. 71-79, 2005.
- MIDGLEY, A. R.; PIERCE, G. B.; DENEAU, G. A.; GOSLING, J. R. Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. **Science**, v. 141, n. 3578, p. 349-350, 1963.
- MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 39, n. 1, p. 23-29, 2009.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin infect dis.**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.
- MOORE, K. W.; DE WAAL, M. R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MOORE, K., SULLIVAN, M. H., ELDER, M. G., MOSCOSO, G., TAYLOR, K. M. Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 2, n. 90, p. 91-687, 1993.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; LA REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J Immunol.**, v. 167, n. 6, p. 4574-4584, 2001.

MOREIRA, L. S.; PIVA, B.; GENTILE, L. B.; MESQUITA-SANTOS, F. P.; D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C.; DIAZ, B. L. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE₂ synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipidbodies of epithelial cells. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1791, n. 3, p. 156-165, 2009.

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

MOTA, L. A.; ROBERTO-NETO, J.; MONTEIRO, V. G.; LOBATO, C. S.; OLIVEIRA, M. A.; CUNHA, M. D.; D'AVILA, H.; SEABRA, S. H.; BOZZA, P. T.; DAMATTA, R. A. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 767-774, 2014.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Prog Lipid Res.**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2004.

NISHIKAWA, Y.; QUITTNAT, F.; STEDMANN, T. T.; VOELKER, D. R.; CHOI, J. Y.; ZAHN, M.; YANG, M.; PYPART, M.; JOINER, K. A.; COPPENS, I. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 6, p. 849-867, 2005.

NOLAN, S. J.; ROMANO, J. D.; COPPENS, I. Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **PloS Pathog.**, v. 13, n. 6, p. 1-38, 2017.

PACHECO, P.; BOZZA, F. A.; GOMES, R. N.; BOZZA, M.; WELLER, P. F.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **J Immunol.**, v. 169, n. 11, p. 6498-6506, 2002.

PATTILLO, R. A.; GEY, G. O. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. **Cancer Res.**, v. 28, n. 7, p. 1231-1236, 1968.

PENG, H. J.; CHEN, X. G.; LINDSAY, D. A. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **J Parasitol.**, v. 97, n. 4, p. 620-628, 2011.

PEREIRA, A. C. A. **A susceptibilidade à infecção pelas cepas ME49 e RH de *Toxoplasma gondii* é dependente de ciclooxigenases em modelo experimental *Calomys callosus*.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2016.

PERNAS, L.; BEAN, C.; BOOTHROYD, J. C.; SCORRANO, L. Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* by Limiting Its Uptake of Fatty Acids. **Cell Metab.**, v. 27, n. 4, p. 886-897, 2018.

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

PRATTES, S.; HORL, G.; HAMMER, A.; BLASCHITZ, A.; GRAIER, W. F.; SATTTLER, W.; ZECHNER, R.; STEYRER, E. Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. **J Cell Sci.**, v. 113, n. 17, p. 2977-2989, 2000.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. **Els Saund**, v. 31, p. 947-1091, 2006.

REY, L. Parasitologia. 3º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S. A. 2001.

REY, L. Parasitologia. 4º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S. A. 2008.

RIBEIRO, M.; FRANCO, P. S.; LOPES-MARIA, J. B.; ANGELONI, M. B.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; CASTRO, A. S.; SILVA, R. J. D.; MILIAN, I. C. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; IETTA, F.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. **Exp Parasitol.**, v. 181, p. 111-118, 2017.

ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; ROBENEK, M. J.; TROVER, D.; SEVERS, N. J. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. **J Cell Sci.**, v. 119, n. 20, p. 4215-4224, 2006.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **J Infect.**, v. 68, n. 1, p. S125-133, 2014.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; FINOL, H. J.; PULIDO-MÉNDEZ, M.; MÁRQUEZ, A.; ANDRADE, G.; GONZÁLEZ, N.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M. E.; PINTO, A. Liver

ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. **J Submicrosc Cytol Pathol.**, v. 30, n. 2, p. 299-307, 1998.

SAEIJ, J. P.; COLLER, S.; BOYLE, J. P.; JEROME, M. E.; WJITE, M. W.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression By infection of a polymeric kinase homologue. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 324-327, 2007.

SAKA, H. A.; VALDIVIA, R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 28, p. 411-437, 2012.

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

SEEBER, F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.**, v. 3, n. 2, p. 99-109, 2003.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82-85, 1992.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

SIBLEY, L. D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 21, n. 5, p. 592-598, 2010.

SILVA, J. C.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. **J Parasitol.**, v. 88, n. 2, p. 419-420, 2002.

SIMÕES, A. P.; ROELOFSEN, B.; OP DEN KAMP, J. A. Incorporation of free fatty acids can explain alterations in the molecular species composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human erythrocytes as induced by *Plasmodium falciparum*. **Cell Biol Int Rep.**, v. 16, n. 6, p. 533-545, 1992.

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

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; ZHU, X. Q.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Globally diverse

Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, 2012.

TATAKIHARA, V. L. H.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 52, n. 1, p. 47-58, 2008.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

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

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.**, v. 31, n. 2, p. 217-220. 2001.

THOMSEN-ZIEGER, N.; SCHACHTNER, J.; SEEBER, F. Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid. **FEBS Lett.**, v. 547, n. 1-3, p. 80-86, 2003.

TOMLEY, F. M.; SOLDATI, D. S. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 2, p. 81-88, 2001.

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. J.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am J Ophthalmol.**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

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

VERONESI, R.; FOCASSIA, R. Tratado Infectológico. 5. ed. São Paulo. 1996.

WALLON, M.; COZON, G.; ECOCHARD, R.; LEWIN, P.; PEYRON, F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. **Eur J Pediatr.**, v. 160, n. 9, p. 534-540, 2001.

WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; STRIEPEN, B.; ROOS, D. S.; HUNTER, C.A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.**, v.23, p. 291-296, 2001.

WOLFE, M. W. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. **Methods Mol Med.**, v. 121, p. 229-239, 2006.

YAN, CHAO.; LIANG, L. J.; ZHENG, K. Y.; ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 137, p. 1-7, 2016.

YANG, M.; CHEN, Y.; WANG, K.; PAN, T.; LIU, X.; XU, W. miR-15b-AGO2 play a critical role in HTR8/SVneo invasion and in a model of angiogenesis defects related to inflammation. **Placenta**, v. 41, p. 62-73, 2016.

YAROVINSKY, F.; HIENY, S.; SHER, A. Recognition of *Toxoplasma gondii* by TLR11 prevents parasite-induced immunopathology. **J Immunol.**, v. 181, n. 12, p. 8478-8484, 2008.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626-1629, 2005.

10. ANEXOS

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

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

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

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

e-mail: cep@propp.ufu.br ; www.comissoes.propp.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

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

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

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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