

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PÂMELA MENDONÇA GUIRELLI

2019

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

PÂMELA MENDONÇA GUIRELLI

Células endoteliais humanas (HUVEC) infectadas por *Toxoplasma gondii*
modulam funções biológicas de células trofoblásticas extravilosas humanas
(HTR-8/SVneo)

UBERLÂNDIA

2019

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

PÂMELA MENDONÇA GUIRELLI

Células endoteliais humanas (HUVEC) infectadas por *Toxoplasma gondii*
modulam funções biológicas de células trofoblásticas extravilosas humanas
(HTR-8/SVneo)

Tese apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas, da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
parcial a obtenção do Título de Doutor.

ORIENTADOR: Prof^a. Eloisa Amália Vieira
Ferro

UBERLÂNDIA

2019

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

G965c Guirelli, Pâmela Mendonça, 1990
2019 Células endoteliais humanas (HUVEC) infectadas por *Toxoplasma gondii* modulam funções biológicas de células trofoblásticas extravilosas humanas (HTR-8/SVneo) [recurso eletrônico] / Pâmela Mendonça Guirelli. - 2019.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1219>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Gravidez. 4. Trofoblastos. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Pâmela Mendonça Guirelli

“Células endoteliais humanas (HUVEC) infectadas por *Toxoplasma gondii* modulam funções biológicas de células trofoblásticas humanas extravilosas (HTR-8/S Vneo)”

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

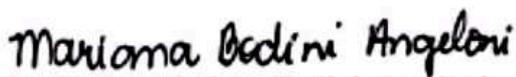
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 21 de fevereiro de 2019.


Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM


Prof. Dra. Idessania Nazareth da Costa
UEL


Prof. Dra. Mariana Bodini Angeloni
UFG


Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
ICBIM/UFU


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

*Dedico esse trabalho aos meus pais, que
através de muito esforço e sacrifício, permitiram que
eu chegasse a esse momento e me tornasse a pessoa
que sou hoje.*

*“Os seres humanos pensam por que existem, quando, o importante é que existem porque pensam, e assim o fazendo, conseguiram criar tecnologia (...) necessária para vencer as variadas ameaças ao seu viver (...), avançando e ampliando os limites do conhecimento, para quem sabe um dia, poder responder à pergunta inicial:
do por que existimos ?”*

Dimos Iksilara

De nada adiantaria encontrar o porquê da nossa existência se nesse período não vivermos com o propósito de nos melhorar intelectualmente e moralmente e, assim, fazer sentido no mundo que habitamos. No decorrer de nossa existência, várias caminhadas em busca de conquistas são necessárias, mas inúmeros obstáculos se fazem presentes e a partir deles nos tornamos pessoas melhores, mais maduras e mais fortes. Ao trilharmos esses caminhos com diversos objetivos, Deus, ciente das fraquezas humanas e com sua infinita misericórdia, permite que pessoas especiais convivam conosco e nos auxilie, incentivando-nos sempre a seguir em frente e a não perder o foco, independentemente das adversidades.

Durante toda a trajetória que me trouxe até a conclusão do doutorado, foi necessário uma base sólida e estruturada, que me desse condições materiais, psicológicas e emocionais para concluir mais essa etapa. Senhor, obrigada por me conceder a vida, através dos meus pais, por sempre iluminar os meus passos, guiar as minhas escolhas e por permitir que esses dois seres de amor pudessem estar comigo até agora, desde às primeiras palavras, o primeiro texto, a aprovação no vestibular até a conclusão de mais uma etapa dessa jornada acadêmica. A sensação de dever cumprido não seria tão prazerosa se não tivesse com quem dividir e comemorar. Aos meus pais, Felismar e Marizete, aos meus irmãos Públio e Paola, muito obrigada pelo amor, carinho e atenção que me cercam diariamente, pelos conselhos nos momentos de dúvidas e por sempre acreditarem em mim. Ao meu marido Lucas, companheiro de todas as horas, muito obrigada por todo o carinho e amor dedicados nos momentos de desespero e angústia, pelo incentivo nos momentos de desânimo, pela tolerância nos momentos de estresse, pela

companhia durante todos os fins de semana e feriados no laboratório, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência, pelo companheirismo e parceria em todos os meus projetos e sonhos. Amo muito você. Se hoje cheguei até aqui, foi porque vocês me deram segurança para seguir e a certeza de que não estaria sozinha. Que Deus permita estarmos sempre juntos, nos apoiando mutuamente, sendo sempre os melhores amigos. Obrigada por serem exatamente como são; meu apoio, minha inspiração, meu porto seguro, cada um com sua característica... Vocês fazem a minha vida ter sentido e por isso, os amo muito a cada dia mais e mais.

Inúmeras pessoas importantes a quem hoje agradeço de coração, também fizeram parte desse trajeto que definitivamente o deixaram mais leve...

À minha orientadora, Eloisa... muito obrigada por me conceder a oportunidade de fazer parte de sua equipe desde o segundo período da graduação. Suas aulas impecáveis que encantava a todos os alunos pela sua didática, me deixava orgulhosa em ser sua orientada. Definitivamente, todos esses anos de convivência me possibilitou um imenso crescimento pessoal e profissional. Agradeço imensamente pela confiança, pelo apoio, pelo reconhecimento de meu esforço e pelo carinho de sempre.

À Angelica, Bellisa, Mariana e Priscila meu eterno muito obrigada por serem minha referência, durante toda minha jornada, vocês estiveram sempre presentes auxiliando desde a elaboração do desenho experimental, execução dos protocolos de pesquisa, até à interpretação de resultados e leitura minuciosa de vários trabalhos. A minha formação profissional não teria sido a mesma sem vocês ao meu lado. Obrigada

pelo carinho que me acolheram, pela paciência nos momentos de dúvida ou desespero, pelo exemplo de pessoas solidárias e prestativas que são.

À Andressa, Fernanda, Idessânia, Iliana, Leticia, Mayara e Rafaela, vocês tornaram minha caminhada muito mais feliz e fizeram com que alguns momentos difíceis fossem vistos com mais otimismo e descontração. Agradeço pelo apoio durante os experimentos que muitas vezes se tornaram coletivos, por estarem sempre prontas a ajudar e “salvar” quando algo dava errado na cultura, pelas ideias concedidas, e principalmente pela amizade... cada desabafo, choro, crise de riso, broncas, horas de trabalho perdidas em função de conversas sobre a vida, fizeram toda a diferença nesse período de convivência diária no laboratório. Que o frescor da nossa amizade se mantenha por longos anos, e que mesmo com as eventuais distâncias, a sensação de termos nos visto ontem, quando nos reencontrarmos, seja sempre igual. Levarei ótimas recordações desse período e vocês estarão para sempre em meu coração, espero tê-las em meu caminho.

À Alessandra, Anna, Camila, Guilherme, Juliana, Lara, Luana, Maria Thereza, Marina, Matheus e Thádia, muito obrigada pelo convívio, pelas conversas e favores sempre concedidos.

À meus familiares, sogros, cunhada e amigos pelo apoio, confiança e carinho.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. TOXOPLASMOSE	13
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> : CARACTERIZAÇÃO	14
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i> : ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO	16
1.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO	17
1.5. GESTAÇÃO: INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS MATERNAS E FETAIS	20
1.6. A IMPORTÂNCIA DE UMA INTERAÇÃO CELULAR ADEQUADA PARA O SUCESSO GESTACIONAL	22
1.7. TRANSMISSÃO VERTICAL E A INFECÇÃO DOS TECIDOS FETAIS	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. CULTURA DE CÉLULAS	28
4.2. CULTURA DE PARASITOS	28
4.3. CO-CULTURA ENTRE CÉLULAS HTR-8/SVneo E CÉLULAS HUVEC	29
4.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA (ELISA)	30
4.5. ENSAIO DE INVASÃO	31
4.6. ENSAIO DE MIGRAÇÃO	32
4.7. ENSAIO DE DETECÇÃO DE APOPTOSE	32
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
5.1. INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS HTR-8/SVneo E HUVEC MODULA A SECREÇÃO DE CITOCINAS	34
5.2. CÉLULAS HUVEC INFECTADAS E O TRATAMENTO COM ISO-1 ALTERAM A CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS HTR-8/SVneo	35

5.3. CÉLULAS HUVEC INFECTADAS DIMINUÍRAM A CAPACIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS HTR-8/SVneo	35
5.4. CÉLULAS HUVEC INFECTADAS E O TRATAMENTO COM ISO-1 ALTERAM A O ÍNDICE DE MORTE CELULAR DAS CÉLULAS HTR-8/SVneo	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	44
7.1. CONCLUSÃO GERAL.....	44
7.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	44
8. FIGURAS	45
FIGURA 1	46
FIGURA 2	47
FIGURA 3	48
FIGURA 4	49
FIGURA 5	50
FIGURA 6	51
9. ANEXO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

RESUMO

A interação entre os trofoblastos extravilosos humanos e as células endoteliais desempenha um importante papel nos processos de implantação embrionária e placentação. Alterações nos padrões de comunicação entre estas duas populações celulares estão associadas com complicações gestacionais, neste contexto, a infecção por *Toxoplasma gondii* pode ser um problema em potencial para essa relação. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os fenômenos de invasão, migração e morte celular de células trofoblásticas extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) sob a influência de células endoteliais venosas (linhagem HUVEC) infectadas por *T. gondii*. As células HTR-8/SVneo foram co-cultivadas com as células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii*, no sentido de avaliar a produção de citocinas detectadas pelo método de ELISA, bem como funções biológicas das células trofoblásticas extravilosas. A capacidade invasiva das células trofoblásticas foi analisada diante a utilização de insertos de *transwell* previamente cobertos com Matrigel, a capacidade migratória dessas células foi verificado pelo ensaio de *scratch* e o índice de morte celular foi mensurado através do método de citometria de fluxo. A interação entre as células HTR-8/SVneo e HUVEC induziram a secreção de IL-6 e IL-8 pelas células trofoblásticas. Já a secreção de MIF foi diminuída pelas células HTR-8/SVneo após a co-cultura com as células HUVEC não infectadas, e maiores níveis dessa citocina foram observados após a co-cultura com células HUVEC infectadas. O estímulo da co-cultura com células HUVEC não infectadas reduziu a capacidade invasiva e aumentou a migração de células HTR-8/SVneo. De forma contrária, as condições de células HUVEC infectadas aumentaram a capacidade invasiva, reduziram a migração e induziram o índice de morte celular das células trofoblásticas. O tratamento com ISO-1, inibidor altamente específico de MIF, alterou os eventos relacionados com a capacidade invasiva e morte celular das células HTR-8/SVneo quando comparados com cada condição respectiva sem o tratamento com inibidor de MIF. A comunicação entre as células trofoblásticas extravilosas e células endoteliais venosas foi modificada pela infecção por *T. gondii* e a indução da produção de MIF pelas células HTR-8/SVneo juntamente com a alteração dos índices de morte celular, podem ter sido alguns dos fatores responsáveis pela variação das funções trofoblásticas relacionadas à capacidade invasiva e migratória das células trofoblásticas extravilosas.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, trofoblastos extravilosos, células endoteliais, invasão, apoptose, gestação.

ABSTRACT

The interaction between human extravillous trophoblast and human endothelial cells has an important role in embryonic implantation and placentation. Changes in communication patterns between these two cell populations are associated with pregnancy complications, in this context, *Toxoplasma gondii* infection can be a potential problem in this crosstalk. Therefore, the aim of this study was to evaluate the occurrence of invasion, migration and cell death of extravillous trophoblast cells (HTR-8/SVneo cell line) under influence of infected human venous endothelial cell (HUVEC) by *T. gondii*. HTR-8/SVneo cells were co-cultured with *T. gondii*-infected or uninfected HUVECs in order to analyze cytokine production by ELISA as well biological functions of extravillous trophoblast cells. The invasive capacity of trophoblastic cells was analyzed using transwell inserts previously covered with Matrigel, the migratory capacity of these cells was verified by scratch method and the cell death index was measured by the flow cytometry. HTR-8/SVneo cells and HUVECs interaction induced secretion of IL-6 and IL-8 by trophoblastic cells. MIF secretion was downregulated by HTR-8/SVneo cells after co-culture with uninfected HUVECs, but upregulated MIF levels were detected after co-culture with infected HUVECs. Stimuli of uninfected HUVECs co-culture reduced invasive capacity and increased migration of HTR-8/SVneo cells. Otherwise, infected HUVECs condition enhanced invasive capability, reduced migration, induced cell death index of trophoblastic cells. The treatment with ISO-1, highly specific MIF inhibitor, altered the events related to invasive capacity and cell death of HTR-8/SVneo when compared to each conditions without treatment with MIF inhibitor. The extravillous trophoblast-venous endothelial cells crosstalk was changed by *T. gondii* infection and induction of MIF production by HTR-8/SVneo cells together with changes in cell death index, might be some of the factors responsible for alteration in trophoblastic functions related to migratory and invasive capacity of extravillous trophoblastic cells.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*, extravillous trophoblast, endothelial cells, invasion, apoptosis, pregnancy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma doença infecciosa com taxas de soropositividade que variam de 10% a 90% na população mundial e estima-se que aproximadamente um terço da população humana apresenta a fase crônica da infecção (Fallahi *et al.*, 2018). Neste sentido a toxoplasmose é uma das doenças parasitárias mais comuns do mundo (Piao *et al.*, 2018).

O agente causador desta zoonose é o protozoário, parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* e, na maioria dos casos os portadores da infecção são assintomáticos (Kato, 2018; Sasai *et al.*, 2018). Contudo, podem surgir manifestações clínicas como mialgia, mal estar, febre, dor de cabeça, alterações ou até mesmo a perda total da visão durante a fase aguda da doença, devido à alta concentração de parasitos no sangue e, conseqüentemente, ao alto índice de disseminação pelo organismo (Montoya; Liesenfeld, 2004). Essas manifestações podem ser recorrentes até o início da fase crônica da infecção, definida pelo estabelecimento da resposta imunológica contra o patógeno. O desenvolvimento da resposta imune protetora não é capaz de eliminar o parasito completamente, uma vez que *T. gondii* se encista como forma de evasão do sistema imunológico, e este pode permanecer em estado de latência por toda a vida do hospedeiro (Jeffers *et al.*, 2018; Sasai *et al.*, 2018).

A principal via de infecção humana por *T. gondii* ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida, alimentos e água contaminados, bem como pelo contato direto com fezes de gatos infectados (Montoya; Liesenfeld, 2004; Fallahi *et al.*, 2018). Alternativamente, a infecção pode se manifestar na infância em consequência da transmissão vertical no curso da infecção materna (Jones *et al.*, 2001). Neste caso, a gestante é infectada durante a gestação ou quando ocorre a reativação da infecção em mulheres grávidas com toxoplasmose prévia latente (Fallahi *et al.*, 2018). Na transmissão congênita, o parasito ganha a circulação fetal após haver passagem pela placenta (Jeffers *et al.*, 2018), contudo os índices de transmissão transplacentária e a gravidade dos danos fetais dependem do período gestacional (Fallahi *et al.*, 2018).

A placenta possui um importante papel na transmissão transplacentária. Ela é uma barreira natural de proteção do feto contra agentes infecciosos sendo mais efetivo no início da gestação, e se torna mais permeável ao final desse período (Fallahi *et al.*, 2018). Durante o primeiro e segundo trimestres da gestação existem menos que 10% e 30%, respectivamente,

de chances de transmissão (Fallahi *et al.*, 2018), mas consequências graves como morte fetal e aborto podem ocorrer (Jones *et al.*, 2001). Tardiamente, durante as últimas semanas do terceiro trimestre, as chances de transmissão transplacentária aumentam até quase 90% (Fallahi *et al.*, 2018), entretanto, os danos fetais são mais amenos, notoriamente sequelas tardias como síndromes neurológicas, deficiências neurocognitivas e coriorretinites podem ser apresentadas (Jones *et al.*, 2001, Fallahi *et al.*, 2018).

A toxoplasmose congênita é uma doença de prevalência mundial com aproximadamente 200.000 casos relatados a cada ano, e a América do Sul é o continente que apresentou casos de maior carga parasitária global (Torgerson; Mastroiacovo, 2013). No Brasil, a estimativa de relatos por ano varia entre 6.000 e 9.000 casos (Torgerson; Mastroiacovo, 2013), além disso, a cada 10.000 nascimentos de 3 a 10 recém-nascidos são diagnosticados com a toxoplasmose congênita (Piao *et al.*, 2018). Apesar de várias evidências epidemiológicas indicarem que a toxoplasmose é uma importante doença na medicina reprodutiva, é frequentemente ignorada pela obstetrícia, ginecologia ou clínicas de saúde reprodutiva tornando-a uma infecção tropical negligenciada (Fallahi *et al.*, 2018). Assim, é essencial compreender melhor os fatores celulares, moleculares e biológicos associados à interação de *T. gondii* com o hospedeiro, bem como imunopatologias e imunidade protetiva da toxoplasmose congênita a fim de controlar esta desordem com potencial trágico que ameaça à saúde humana (Piao *et al.*, 2018).

1.2. *Toxoplasma gondii*: CARACTERIZAÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório do filo Apicomplexa (Ortiz-Alegría *et al.*, 2010) que geralmente apresenta um aspecto alongado e arqueado com a região anterior afilada e a extremidade posterior arredondada (Dubey *et al.*, 1998), apesar de sua morfologia depender do seu estágio de desenvolvimento (Robert-Gangneux; Darde, 2012). O parasito apresenta um núcleo central e várias organelas comuns e exclusivas ao filo (Dubey *et al.*, 1998) estando organizadas de forma altamente polarizada (Venugopal; Marion, 2018). Particularmente, na região anterior é encontrado o complexo apical, caracterizado por um complexo de membranas composto por elementos do citoesqueleto, como os anéis polares, e logo abaixo dessa região localiza-se o conoide (Dubey *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2010). Ainda associadas ao complexo apical, as micronemas, as roptrias e os grânulos densos, estes últimos dispersos pelo citoplasma (Dubey *et al.*, 1998;

Souza *et al.*, 2010), são organelas secretoras essenciais em uma série de funções abrangendo processos desde a adesão e invasão das células do hospedeiro, o estabelecimento e manutenção do vacúolo parasitóforo, até a replicação e sobrevivência do parasito (Venugopal; Marion, 2018).

Após o posicionamento perpendicular de *T. gondii* em relação à superfície celular, a partir do reconhecimento pelo parasito dos receptores de membrana da célula alvo, o processo de adesão e invasão é iniciado (Souza *et al.*, 2010). Assim, as micronemas, organelas apicais, em formato de bastão, responsáveis pela adesão e regulação da motilidade do patógeno até à invasão da célula hospedeira, secretam moléculas adesivas denominadas MIC (Carruthers, 2006; Venugopal; Marion, 2018).

Imediatamente após esse primeiro reconhecimento, as roptrias que apresentam a região basal mais larga e uma porção mais fina (pescoço da organela) voltada para a porção apical, secretam moléculas proteicas que são expelidas pelo conoide. A secreção de proteínas pelas roptrias possivelmente se dão em dois momentos: as originadas na porção mais fina da organela, conhecidas como RONS, são secretadas primeiro e em seguida as ROPs, roptrias originadas da região basal (Carruthers, 2006; Souza *et al.*, 2010). As proteínas RON são mobilizadas para a superfície do parasito onde se associam com as micronemas formando uma estrutura adesiva transitória em forma de anel, denominada junção de movimento, que possibilita a propulsão do parasito para dentro da célula hospedeira (Carruthers, 2006; Kato, 2018; Venugopal; Marion, 2018). Já as ROPs secretadas após a formação da junção de movimento são secretadas para a formação da membrana do vacúolo parasitóforo, garantindo uma natureza não fusogênica ao mesmo (Venugopal; Marion, 2018) e, assim, o parasito penetra ativamente pela membrana da célula hospedeira (Dubey *et al.*, 1998) através de um movimento de deslizamento denominado *gliding*, o qual é promovido por actina/miosina, que são elementos do citoesqueleto (Carruthers; Boothroyd, 2007; Caldas; Souza, 2018).

Ao passo que as micronemas e roptrias secretam seu conteúdo durante as fases de adesão e invasão, os conteúdos dos grânulos densos são essenciais na fase intracelular do parasito. Os grânulos densos são organelas esféricas secretoras de glicoproteínas, conhecidas como GRA, que compõe e mantém a estrutura e integridade do vacúolo parasitóforo, além de estarem relacionadas à sobrevivência do parasito modulando respostas imune e metabólica do hospedeiro (Venugopal; Marion, 2018).

1.3. *Toxoplasma gondii*: ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

O protozoário possui três estágios de desenvolvimento, sendo todos eles infectantes (Robert-Gangneux; Darde, 2012). Os **taquizoítos**, caracterizados pela forma alongada e arqueada, são capazes de invadir muitos tipos celulares e multiplicar rapidamente, permitindo a disseminação pelo organismo e por isso é responsável pelas manifestações na fase aguda da infecção (Dubey *et al.*, 1998; Hunter; Sibley, 2012).

Uma vez no hospedeiro, a pressão de uma resposta imune funcional induz a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos e, como mecanismo de evasão do próprio parasito, passam a sobreviver em estado de latência caracterizando a fase crônica da infecção (Jeffers *et al.*, 2018). Nesse estágio, os **bradizoítos** são morfológicamente semelhantes aos taquizoítos, mas proliferam mais lentamente devido ao metabolismo mais lento propiciado pela maior quantidade de grânulos de amilopectina (Jeffers *et al.*, 2018). São encontrados no interior de cistos teciduais formados nos tecidos nervoso, muscular e óptico, e pode ser considerada uma forma de resistência do parasito ao sistema imune (Kawazoe, 2005). Os cistos podem permanecer nos tecidos por toda a vida do hospedeiro, mas em casos de imunossupressão, a infecção pode reativar, os bradizoítos se convertem novamente em taquizoítos e ao se multiplicarem rapidamente, rompem os cistos teciduais, liberando parasitos que infectarão outras células pelo organismo hospedeiro (Jeffers *et al.*, 2018).

Os **esporozoítos** são encontrados no interior de oocistos, são ovais ou elípticos e possuem uma parede dupla muito resistente ao meio ambiente caracterizando o estágio de resistência. Quando liberados, juntamente com as fezes dos felinos, são imaturos, entretanto em condições ambientais favoráveis, podem esporular originando dois esporocistos contendo em cada um quatro esporozoítos (Dubey *et al.*, 1998).

A infecção causada por *T. gondii* acomete uma grande variedade de animais vertebrados endotérmicos incluindo os humanos (Ortiz-Alegría *et al.*, 2010; Fallahi *et al.*, 2018), mas os felinos do gênero *Felix* e *Linx* são os únicos hospedeiros definitivos (Rey, 2001). O ciclo biológico se inicia quando um felino ingere qualquer uma das formas infectantes (cistos contendo bradizoítos, oocistos contendo esporozoítos ou taquizoítos) (Dubey, 2004). Geralmente, a infecção se dá pela ingestão de cistos teciduais que uma vez situados no trato gastrointestinal, sofrem a ação de enzimas proteolíticas ocasionando a liberação de inúmeros bradizoítos. Estes penetram nas células epiteliais do estômago e intestino, se convertem em

taquizoítos e iniciam a multiplicação por merogonia para originar merozoítos. Os merozoítos liberados invadem novas células epiteliais e iniciam a etapa sexuada do ciclo, assim se desenvolvem em macrogametas (gametas femininos) ou em microgametas flagelados (gametas masculinos) que poderão se fundir e originar o zigoto. Depois da fertilização, uma parede externa envolve o zigoto formando o oocisto imaturo e, quando há lise da célula hospedeira, é liberado na luz intestinal sendo eliminado para o meio ambiente juntamente com as fezes dos felinos. No ambiente, em condições favoráveis de temperatura e umidade, esse oocisto imaturo sofre esporulação originando os esporozoítos, formas infectantes aos hospedeiros intermediários (Robert-Gangneux; Darde, 2012).

Os seres humanos, quando infectados, são considerados hospedeiros intermediários e uma vez os parasitos livres no organismo podem se converter em taquizoítos, multiplicar intensamente por endodiogenia, e disseminar pelo corpo (fase aguda da infecção) (Robert-Gangneux; Darde, 2012). Com o desenvolvimento da resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito, os taquizoítos se encistam no interior de células e se diferenciam em bradizoítos, dando início a fase crônica da infecção (Sasai *et al.*, 2018). Conseqüentemente, a quantidade de parasitas circulantes é diminuída e não havendo distúrbios no sistema imunológico, a fase crônica pode se estender por toda a vida do hospedeiro (Montoya; Liesenfeld, 2004).

1.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO

O sistema imunológico do hospedeiro frente a uma infecção pode elaborar respostas tanto da imunidade inata quanto da adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções por patógenos, onde os hospedeiros infectados devem detectar a invasão e prevenir sua disseminação (Sasai *et al.*, 2018). Neste processo de restrição de patógenos, *T. gondii* pode ser reconhecido e detectado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) tradicionais como macrófagos e células dendríticas (Abbas; Lichtman, 2007). Dessa maneira, a ativação das APCs se dá pelo reconhecimento de componentes microbianos denominados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) por receptores do tipo *Toll-like receptors* (TLRs) (Sasai *et al.*, 2018). No caso da infecção por *T. gondii* em camundongos, a profilina é reconhecida por receptores TLR11 ou TLR12 que leva ao recrutamento da molécula adaptadora MyD88, a qual iniciará uma cascata imune de sinalização, responsável pela produção de interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ pelas APCs

(Sasai *et al.*, 2018). Em humanos, TLR2 e TLR4 ao detectarem proteínas de ancoragem glicosilfosfatidilinositol (GPI) são efetivos na indução de IL-12 (Hunter; Sibley, 2012). Dessa forma, a imunidade inata amplifica os sinais sobre a presença de uma infecção, acionando os mecanismos da imunidade adaptativa (Abbas; Lichtman, 2007).

A proteção do hospedeiro é propiciada basicamente pela produção de citocinas que está associada com a ativação de uma resposta imune adaptativa (Denkers; Gazzinelli, 1998). Citocinas próinflamatórias como IL-12 e IFN- γ promoverão a ativação de mecanismos efetores para controle da infecção por *T. gondii* (Sasai *et al.*, 2018). A produção de IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos desencadeia a proliferação de células *natural killer* (NK), linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ que produzirão mais IFN- γ (Sasai *et al.*, 2018). Assim, IFN- γ induz a produção de óxido nítrico sintase (NOS), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas células infectadas, bem como outros fatores para o recrutamento de novas APCs, intensificando os mecanismos efetores contra o patógeno, no intuito de conter a disseminação pelo hospedeiro (Jeffers *et al.*, 2018; Sasai *et al.*, 2018).

Outra citocina próinflamatória que também apresenta um papel determinante em infecções causadas por *T. gondii* (Flores *et al.*, 2008; Cavalcanti, *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017) e uma série de outros patógenos é o fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) (Satoskar *et al.*, 2001; Rodriguez-Sosa *et al.*, 2003; Stavitsky *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2006). Essa citocina está relacionada à ativação de células dendríticas e NK, bem como à produção de citocinas próinflamatórias, incluindo IL-12 e IFN- γ que induzirão a produção de NOS, e espécies reativas de oxigênio (ROS), regulando e estabelecendo uma resposta inicial inflamatória eficiente contra a infecção por *T. gondii* (Calandra *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2017).

A resposta imune adaptativa mediada por células é essencial para a eliminação de patógenos intracelulares, e a produção de citocinas, incluindo IL-12, IFN- γ e MIF, estão associadas também com a ativação de linfócitos. Os linfócitos são as principais células responsáveis por oferecer a resistência ao parasito (Filisetti; Candolfi, 2004). Os linfócitos TCD4⁺ auxiliam na manutenção da atividade citotóxica pelas células TCD8⁺ e regulam mecanismos imunes (Combe *et al.*, 2005). Adicionalmente, podem se diferenciar em 3 subpopulações de acordo com o perfil de citocinas predominantemente produzidas no microambiente em que se encontram. Dentre elas, os linfócitos T helper (Th) 1 produzem citocinas próinflamatórias como IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α ; os linfócitos Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13; e os linfócitos T reguladores

(Treg) são produtores de IL-22 (Abbas; Lichtman, 2007). Estas citocinas, por sua vez, estão envolvidas na indução de outros fatores por células vizinhas e no recrutamento e ativação de mais APCs. Nesse sentido, as células do sistema imune inato e adaptativo se comunicam, e em casos de infecção atuam para intensificar a resposta imunológica efetora contra o patógeno e conter a disseminação da infecção pelo organismo (Abbas; Lichtman, 2007).

Diante da infecção por *T. gondii* a produção de citocinas próinflamatórias é fundamental, no entanto, em indivíduos imunocompetentes, citocinas anti-inflamatórias também devem estar presentes para que haja, respectivamente, a proteção contra patógenos e o controle da resposta inflamatória no intuito de evitar danos teciduais (Gude *et al.*, 2004). Nesse sentido, caso o perfil imunológico predominante de controle do parasito seja alterado, como durante a gestação, são verificadas maiores possibilidades de infecção dos tecidos maternos e fetais, bem como possíveis chances de rejeição fetal (Remington *et al.*, 2001).

No decorrer do período gestacional estão envolvidos tanto o perfil próinflamatório essencial para a implantação embrionária, placentação e parto, quanto o perfil anti-inflamatório predominante que possibilita a tolerância imunológica materna frente aos tecidos fetais (Vargas-Villavicencio *et al.*, 2009). Dessa forma, se o parasito, que é controlado por um perfil próinflamatório, acomete gestantes a partir do segundo trimestre caracterizado por um perfil anti-inflamatório tolerogênico, tecidos maternos e fetais se tornam mais susceptíveis a infecção (Sykes *et al.*, 2012). Trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que células trofoblásticas humanas de linhagem BeWo foram altamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* na presença de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- β 1 (Barbosa *et al.*, 2008). No entanto, caso a infecção ocorra durante o primeiro trimestre gestacional em que o perfil imunológico é predominantemente inflamatório, o excesso de um perfil Th1 pode ocasionar condições patológicas como a pré-eclâmpsia, assim como os riscos de rejeição fetal aumentam (Hill, 1995; Saito; Sakai, 2003; Yeh *et al.*, 2013).

MIF é uma importante citocina próinflamatória também presente durante o período gestacional e está envolvida no processo de implantação embrionária ao permitir ou induzir a invasão por células epiteliais do blastocisto, denominadas como trofoblastos (Bevilacqua *et al.*, 2014; Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015). Estudos demonstram que MIF estimulou significativamente a capacidade invasiva dos citotrofoblastos e células HTR-8/SVneo, bem como a neutralização endógena da citocina inibiu esse efeito (Jovanović Krivokuća *et al.*,

2015). Ainda assim, estudos prévios do nosso grupo demonstraram, diante da infecção por *T. gondii*, a indução da produção de MIF por células da interface materno-fetal e o desenvolvimento de um perfil inflamatório para proteção do hospedeiro e controle da toxoplasmose (Ferro *et al.*, 2008; de Oliveira Gomes *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2018). No entanto, a produção de MIF induzida durante a gravidez e sinergicamente aumentada em casos de infecção por *T. gondii* durante a gestação podem comprometer o sucesso do desenvolvimento fetal, uma vez que, altas concentrações desta citocina podem estar relacionadas à complicações gestacionais como a pré-eclâmpsia (Cardaropoli *et al.*, 2012). Assim, entender os mecanismos que controlam ou alteram funções biológicas de células trofoblásticas é de importância crucial (Sharma *et al.*, 2016).

MIF participa em diversas alterações imunológicas, fisiológicas e patológicas, nesse sentido, inibidores dessa citocina foram desenvolvidos como possíveis estratégias terapêuticas. Dentre estes inibidores, ISO-1 ((S,R)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5 isoxazol ácido acético metil éster) é um inibidor altamente específico de MIF (Al-Abed *et al.*, 2005; Al-Abed *et al.*, 2011). Essas pequenas moléculas inibidoras de MIF, se ligam dentro do sítio catalítico alterando a atividade próinflamatória de MIF. Este inibidor tem efeitos benéficos em diversas doenças como colite (Shah *et al.*, 2008), neurite alérgica (Nicoletti *et al.*, 2005) e na endotoxemia (Al-Abed *et al.*, 2005) levando a uma diminuição das atividades de MIF em várias doenças (Al-Abed *et al.*, 2011).

1.5. GESTAÇÃO: INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS MATERNAS E FETAIS

No período gestacional é apresentado ao organismo materno um feto que expressa antígenos tanto maternos quanto paternos. Desse modo a tolerância imunológica induzida pelas células fetais (Salamone *et al.*, 2012), bem como o perfil inflamatório necessário durante a implantação, placentação e o parto, devem ser controlados por um delicado balanço entre os perfis imunológicos Th1/Th2 que garantirão uma gestação de sucesso (Ortiz-Alegría *et al.*, 2010). Células trofoblásticas são essenciais por modularem, de forma direta ou indireta, o perfil tolerogênico fundamental para o desenvolvimento gestacional (Salamone *et al.*, 2012).

No sítio de implantação, o contato direto do blastocisto com os tecidos maternos induz a diferenciação das células trofoblásticas, que apresentarão propriedades e funções distintas relacionadas à placentação (Huppertz *et al.*, 2006). Esse processo inicial assegurará a

aderência da placenta no útero permitindo o acesso de nutrientes e oxigênio ao embrião (Velicky *et al.*, 2016; Moser *et al.*, 2018). Algumas subpopulações celulares também são estabelecidas nesse período, em que o sinciciotrofoblasto, massa multinucleada oriunda da fusão de células do citotrofoblasto, apresenta grande capacidade invasiva e garante a implantação embrionária (Huppertz *et al.*, 2006), e o citotrofoblasto, que constitui a cobertura epitelial dos vilos placentários, situa-se sob a camada externa do sinciciotrofoblasto. Os vilos placentários podem ser classificados como vilos flutuantes e vilos de ancoragem (Aplin, 1991; Pijnenborg, 1994). O citotrofoblasto com intensa capacidade proliferativa adere os vilos de ancoragem aos tecidos maternos (decídua) por meio da formação de colunas de células na base desses vilos. Assim, a medida que o citotrofoblasto viloso extrapola os limites dos vilos, perde sua capacidade proliferativa e adquire uma grande capacidade invasiva, migra por entre as células deciduais e origina o trofoblasto extraviloso (Kaufmann *et al.*, 2003).

O trofoblasto extraviloso infiltra na decídua ao invadir o interstício uterino (trofoblasto intersticial), invade tanto artérias espiraladas quanto veias, bem como glândulas e vasos linfáticos (Moser *et al.*, 2018). Esta capacidade invasiva e migratória desta população celular permitirá a acomodação dos tecidos extraembrionários e aumentarão o suprimento sanguíneo da placenta e, conseqüentemente, o desenvolvimento do feto (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006). O trofoblasto extraviloso que coloniza artérias/veias uterinas e glândulas compreendem os trofoblastos endovasculares e endoglandulares respectivamente (Kaufmann *et al.*, 2003; He *et al.*, 2017; Moser *et al.*, 2017; Moser; Huppertz, 2017; Moser *et al.*, 2018). A invasão pelo trofoblasto endovascular está associada com o remodelamento das artérias espiraladas promovendo a transformação da parede dos vasos arteriais em largos condutores sem o controle vasomotor, permitindo assim um intenso e lento fluxo sanguíneo nos espaços intervilosos (Kaufmann *et al.*, 2003; Velicky *et al.*, 2016; Moser *et al.*, 2018). Ainda assim, apesar de não haver necessidade de uma transformação massiva como nas artérias espiraladas, a invasão das veias deciduais possibilita uma conexão que facilita a migração de células imunes maternas para a interface uteroplacentária (Windsperger *et al.*, 2017), garantindo o retorno do sangue materno (Moser *et al.*, 2018) e o efetivo desenvolvimento da placenta (Craven *et al.*, 2000). A invasão das veias deciduais pode ser um mecanismo de desenvolvimento da placenta, uma vez que vilos flutuantes são atraídos e aderidos ao endotélio venoso formando novas colunas de células e, conseqüentemente, novos vilos de ancoragem (Craven *et al.*, 2000). Já a invasão das glândulas uterinas que se dá

no período da implantação, permite a nutrição histotrófica do embrião. Dessa forma, a invasão pelo trofoblasto dos tecidos maternos e de qualquer estrutura que tenha lúmen na placenta é determinante para o sucesso ou para o surgimento de patologias gestacionais (Moser *et al.*, 2018).

1.6. A IMPORTÂNCIA DE UMA INTERAÇÃO CELULAR ADEQUADA PARA O SUCESSO GESTACIONAL

Entre o útero receptivo e o blastocisto maduro, existem inúmeras e complexas interações que permitem o sucesso da implantação embrionária e, conseqüentemente, a placentação. Um conjunto de atividades operantes de maneira coordenada entre células fetais e maternas possibilitam e controlam a perfusão sanguínea adequada para o feto, uma vez que uma perfusão insuficiente resulta em complicações gestacionais (Burke; Karumanchi, 2013; Fisher, 2015). A interação entre as células trofoblásticas e as células endoteliais tem fundamental importância no remodelamento vascular (Burton; Jauniaux, 2017; He *et al.*, 2017; Moser *et al.*, 2017; Moser *et al.*, 2018) e estão significativamente presentes no lúmen de vasos venosos ou rodeando, em grande número, as artérias espiraladas (Windsperger *et al.*, 2017). Gestações que se caracterizam por um menor índice de vasos não arteriais invadidos por células trofoblásticas apresentam maiores patologias gestacionais (Windsperger *et al.*, 2017).

Diante dessa importante relação intercelular, índices inadequados de invasão relacionados às células trofoblásticas extravilosas, provenientes ou não de processos apoptóticos, podem estar associados com um remodelamento deficiente dos componentes vasculares (Kaufmann *et al.*, 2003; Burton; Jauniaux, 2017; Windsperger *et al.*, 2017).

O processo apoptótico, que atua eliminando células desnecessárias sem que haja processo inflamatório local (Huppertz *et al.*, 2006; Fest *et al.*, 2007), bem como o processo invasivo, são extremamente importantes para o desenvolvimento normal da placenta. Em muitos casos, a invasão superficial da mucosa uterina por células trofoblásticas está associada a índices exacerbados de apoptose, levando a graves complicações gestacionais (Wu *et al.*, 2012). Síndromes como pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, partos prematuros e descolamento da placenta são exemplos de anormalidades placentárias dependentes de uma invasão superficial das artérias espiraladas pelo trofoblasto (Kaufmann *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2007; Whitley *et al.*, 2007). Além disso, o aborto recorrente espontâneo

pode estar associado à uma menor taxa de invasão pelo trofoblasto extraviloso em veias e vasos linfáticos decíduais (Windsperger *et al.*, 2017). Por outro lado, a placenta acreta é resultado de uma invasão excessiva do trofoblasto na mucosa uterina (Tantbirojn *et al.*, 2008). Assim, qualquer alteração no processo invasivo orquestrado pela relação entre trofoblastos e células decíduais, tendo relação com uma infecção ou não, podem causar danos ou a morte do embrião (Kaufmann *et al.*, 2003; Ortiz-Alegría *et al.*, 2010; Windsperger *et al.*, 2017).

As atividades celulares operantes na interface materno fetal são controladas por um conjunto de fatores, parácrinos e autócrinos, como citocinas, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (Gupta *et al.*, 2016). Qualquer desequilíbrio na produção desses fatores solúveis pelas células decíduais pode interferir na atividade e sobrevivência do trofoblasto extraviloso, ou vice-versa, e assim gerar disfunções associadas à invasão do trofoblasto (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006). A variação do perfil de citocinas e fatores solúveis secretados na interface materno fetal podem ser alterados por patologias ou infecções associadas à gestação (Ortiz-Alegría *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 2013; Kaufmann *et al.*, 2003; Piao *et al.*, 2018). Células infectadas por *T. gondii*, diante da resposta imune, bem como a modulação ocasionada pelo próprio parasito para favorecer sua sobrevivência, podem modificar o perfil de produção de citocinas (Brasil *et al.*, 2017), e assim desregular funções de trofoblastos endovasculares (Jovanović; Vićovac, 2009; de Oliveira *et al.*, 2010; Ortiz-Alegría *et al.*, 2010; Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015; Piao *et al.*, 2018). Citocinas como IFN- γ e TGF- β inibem a invasão do trofoblasto extraviloso por mecanismo que envolvem mudanças na apoptose (Lash *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2018). Por outro lado, citocinas próinflamatórias exacerbadas durante a infecção por *T. gondii* (Ortiz-Alegría *et al.*, 2010; Piao *et al.*, 2018), como IL-6, IL-8 e MIF estimulam a invasão por trofoblastos extravilosos (Jovanović; Vićovac, 2009; de Oliveira *et al.*, 2010; Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015), contudo não existe uma opinião consensual envolvendo a relação entre MIF e os eventos de apoptose (Saksida *et al.*, 2012; Stojanovic *et al.*, 2012; Bevilacqua *et al.*, 2014; Angeloni *et al.*, 2015; Ietta *et al.*, 2018).

1.7. TRANSMISSÃO VERTICAL E A INFECÇÃO DOS TECIDOS FETAIS

A transmissão vertical de agentes infecciosos da mãe infectada para o feto, pode levar à consequências devastadoras para o desenvolvimento do mesmo (Jones *et al.*, 2001; Fallahi *et al.*, 2018). Entretanto, para compreender o mecanismo da transmissão vertical é

primariamente essencial definir a principal barreira entre os compartimentos materno e fetal durante a gestação: a placenta (Arora *et al.*, 2017). A placenta humana é caracterizada pelos vilos placentários flutuantes e de ancoragem formados por uma camada interna de citotrofoblasto coberta por sinciotrofoblasto, sendo esta última, banhada por sangue materno e por isso, exposta à microrganismos que podem estar presentes nesse sangue (Arora *et al.*, 2017). A camada do sinciotrofoblasto, afortunadamente, é altamente resistente à infecções por inúmeros patógenos (Arora *et al.*, 2017), incluindo *T. gondii* e pode ser capaz de restringir a adesão e replicação do parasito (Ander *et al.*, 2018). Diferentemente dos vilos flutuantes, os vilos de ancoragem, que estão aderidos aos tecidos maternos pelos trofoblastos extravilosos, estão estrategicamente localizados e em contato com inúmeras populações celulares maternas, incluindo uma variedade de células imunes (Arora *et al.*, 2017).

O trofoblasto extraviloso representa um possível caminho a transmissão vertical de patógenos (Arora *et al.*, 2017). Essa subpopulação celular, diferentemente do sinciotrofoblasto, é mais susceptível à infecção por *T. gondii*, e apesar de ocuparem menos de 5% da superfície placentária no primeiro trimestre, podem apresentar os maiores índices de vacúolos parasitóforos (Robbins *et al.*, 2012). Neste sentido, representam pontos de replicação e porta de entrada para a transmissão de *T. gondii* e outros patógenos (Borges *et al.*, 2018, Arora *et al.*, 2017). Dessa forma, parasitos intracelulares como *T. gondii* são transportados a partir da infecção primária das células imunes até órgãos biologicamente restritos, como a placenta (Piao *et al.*, 2018), podendo atravessar a parede dos vasos através da infecção de células endoteliais (Baba *et al.*, 2017). Estando em contato com inúmeros outros tipos celulares, incluindo as células endoteliais, os trofoblastos extravilosos infectados, podem permitir a transmissão do parasito para tecidos fetais (Arora *et al.*, 2017).

Para melhor compreender o papel do trofoblasto extraviloso, bem como sua interação com as demais subpopulações celulares, como as células endoteliais, relacionando à imunologia da gestação aos processos de implantação e placentação essenciais para um período gestacional de sucesso, diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando linhagens celulares pré-estabelecidas. As células trofoblásticas extravilosas humanas da linhagem HTR-8/SVneo são utilizadas em diversos estudos atuais como modelo para o entendimento do funcionamento placentário e invasão do trofoblasto (Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2018; Banerjee *et al.*, 2019; Xue *et al.*,

2019). Células endoteliais venosas humanas da linhagem HUVEC, isoladas a partir do cordão umbilical, também são utilizadas como modelo em trabalhos atuais pelo fato de possibilitar a compreensão dos aspectos da interação entre células endoteliais e células trofoblásticas (Gao *et al.*, 2015; Tsui *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Multhaup *et al.*, 2018). Finalmente, a presença de patógenos intracelulares como *T. gondii*, podem simular as consequências da interferência desse parasito na comunicação celular operante na interface materno fetal de importância fundamental para o sucesso da gestação (Cortez *et al.*, 2005; Cañedo-Solares *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

No microambiente placentário, a interação entre células trofoblásticas extravilosas e as células endoteliais é essencial para o sucesso gestacional, uma vez que é a partir dessa relação que os processos de implantação, remodelamento vascular e placentação são estabelecidos a fim de garantir condições adequadas para o desenvolvimento fetal (Moser *et al.*, 2018). Inúmeras citocinas e outros fatores solúveis, operantes neste diálogo materno fetal, regulam várias atividades celulares de células trofoblásticas extravilosas, incluindo processos invasivo, migratório e apoptótico (Gupta *et al.*, 2016). Qualquer desequilíbrio, estando associado à uma infecção ou não, pode comprometer tais atividades celulares e levar a graves complicações gestacionais ou até mesmo a morte do embrião (Kaufmann *et al.*, 2003; Ortiz-Alegría *et al.*, 2010; Windsperger *et al.*, 2017). Em resposta à infecção por *T. gondii*, a secreção de MIF é aumentada (Ferro *et al.*, 2008; de Oliveira Gomes *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014), todavia, altas concentrações podem estar relacionadas à patologias associadas à gestação, uma vez que esta citocina também está envolvida no processo de implantação (Cardaropoli *et al.*, 2012; Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015).

Patógenos intracelulares como *T. gondii* podem interferir no processo de comunicação celular e possibilitar a infecção de tecidos fetais, ao alcançar órgãos biologicamente restritos como a placenta (Piao *et al.*, 2018). Células imunes quando atraídas para o sítio primário de infecção podem se infectar, permitir a disseminação do parasito, e facilitar o acesso a vasos uterinos a partir da infecção de células endoteliais, que em contato com trofoblastos extravilosos possibilitam a transmissão do parasito para o interior dos vilos (Arora *et al.*, 2017). Provavelmente, a migração de *T. gondii* pela barreira endotelial de vasos placentários, proporcionado pelas células imunes infectadas, pode ser a principal rota de transmissão do parasito para vários tecidos (Barragan *et al.*, 2005), incluindo os fetais.

Dessa forma são necessários estudos para melhor compreender a influência do parasito no diálogo operante na interface materno fetal. Neste sentido, nosso estudo se propôs a avaliar a participação de células endoteliais HUVEC infectadas por *T. gondii* nas atividades celulares como a invasão, migração e apoptose de células trofoblásticas extravilosas HTR-8/SVneo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da interação entre células trofoblásticas extravilosas humanas da linhagem HTR-8/SVneo e células endoteliais venosas humanas (HUVEC), infectadas ou não por *T. gondii*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, na secreção de citocinas por ambas linhagens celulares.
- Avaliar a influência da interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, na capacidade invasiva das células trofoblásticas.
- Avaliar a influência da interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, e o papel funcional de MIF na capacidade invasiva das células trofoblásticas.
- Avaliar a influência da interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, na capacidade migratória das células trofoblásticas.
- Avaliar a influência da interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, no índice de morte celular das células trofoblásticas.
- Avaliar a influência da interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, e o papel funcional de MIF no índice de morte celular das células trofoblásticas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular do trofoblasto extraviloso humano, HTR-8/SVneo, (gentilmente cedida pela Dra. Estela Bevilacqua, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil) foi imortalizada pela transfecção de células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação com um plasmídeo contendo o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (Graham *et al.*, 1993). A linhagem celular do endotélio da veia do cordão umbilical humano, HUVEC, (gentilmente cedidas pela Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil) foi isolada e modificada conforme Jaffe e colaboradores (1973). A comissão de ética com seres humanos da UFU declara que linhagens celulares humanas obtidas comercialmente não necessitam de autorização por este comitê para seu uso em procedimentos experimentais (Comunicado Número 13/2012) (Anexo).

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (Sarstedt Ag & Co. KG, Nümbrecht, Alemanha), contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, São Paulo, Brasil) e 1% de antibióticos (10.000 U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), denominado meio completo, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

Para o repique das células, um novo meio de cultura foi adicionado ao frasco e, com auxílio de 0,25% tripsina - 0,02% EDTA (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), as células foram retiradas, transferidas para tubos de 15 mL (Sarstedt Ag & Co. KG, Nümbrecht, Alemanha) e centrifugadas a 400 x g em temperatura ambiente por 5 min. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* contendo as células foi ressuspensão em 1 mL de meio completo e distribuído em dois novos frascos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento (soro bovino fetal com 5% de DMSO).

4.2. CULTURA DE PARASITOS

Os taquizoítos do clone 2F1 de *T. gondii*, originados da cepa RH, expressam o gene da enzima β-galactosidase (gentilmente cedidos pelo Dr. Vern B. Carruthers, Escola de Medicina da Universidade de Michigan, Ann Arbor, EUA). Os parasitos foram mantidos em células HUVEC em meio RPMI suplementado com 2% de SBF. À medida que a maioria das células HUVEC encontrava-se lisada pelo parasito, o meio do frasco de cultivo contendo parasitos

livres em suspensão foi transferido para tubos de 15 mL e centrifugado a 400 x g em temperatura ambiente por 5 min. O *pellet* contendo os parasitos foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultivo e distribuído em dois novos frascos contendo células não infectadas.

4.3. CO-CULTURA ENTRE CÉLULAS HTR-8/SVneo E CÉLULAS HUVEC

As células HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 6 poços (7×10^5 células/2 mL/poço) (Kasvi, Paraná, Brasil), enquanto as células HUVEC foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² (3×10^6 células/5 mL) e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* na proporção de 1 parasito por célula (1:1). Ambas linhagens celulares foram mantidas em meio completo por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1A). Após a confluência das células HTR-8/SVneo, o meio completo foi substituído (2,5 mL/poço) e insertos de *transwell* para placas de 6 poços (membrana de policarbonato com 24 mm de diâmetro e poros de 0,4 µm) (Corning Corstar Corp., Massachusetts, EUA) foram inseridos ou não (controle) dentro dos poços. As células HUVEC infectadas ou não foram plaqueadas ($1,5 \times 10^5$ células/1,5 mL/poço) na câmara superior dos insertos de *transwell* e mantidas em meio completo por adicionais 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1B). Em seguida, os sobrenadantes obtidos durante o ensaio de co-cultura, nomeados como “co-cultura”, foram coletados e estocados a -80°C. Para a coleta do sobrenadante após a co-cultura, as células HTR-8/SVneo foram mantidas nas placas de 6 poços e os insertos de *transwell* com células HUVEC, infectadas ou não, foram removidos e colocados em uma nova placa sem a influência das células HTR-8/SVneo. O meio completo de ambas linhagens celulares foi substituído (1,5 mL na câmara superior do *transwell* com células HUVEC e 2,5 mL no poço com células HTR-8/SVneo) e as mesmas foram mantidas por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1C). Após esse período, os sobrenadantes obtidos após o ensaio de co-cultura, nomeados “após co-cultura”, foram coletados e estocados a -80°C para o ensaio de detecção de citocinas (Figura 1D).

Paralelamente, as células HTR-8/SVneo após o período de 24 h em co-cultura foram utilizadas nos ensaios de invasão, migração ou morte celular. Para o ensaio de invasão, os insertos de *transwell* com células HUVEC foram descartados e as células HTR-8/SVneo foram removidas das placas de 6 poços e plaqueadas (3×10^4 células/100 µL de meio a 1% FBS) na câmara superior dos insertos de *transwell* para placas de 24 poços (membrana de policarbonato com 6,5 mm de diâmetro e poros de 8,0 µm) (Corning Corstar Corp., Massachusetts, EUA). Essas mesmas células ainda foram tratadas ou não com o antagonista

de MIF, ISO-1 (100 µg/mL) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (Al-Abed *et al.*, 2005) por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1C). Para o ensaio de migração, os insertos de *transwell* com células HUVEC foram descartados, as células HTR-8/SVneo foram mantidas nas placas de 6 poços e a monocamada de células foi interrompida com um traço em linha reta para análise da migração das células trofoblásticas por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1C). Para detecção do índice de morte celular, os insertos de *transwell* com células HUVEC foram descartados, as células HTR-8/SVneo foram mantidas nas placas de 6 poços e tratadas ou não com o antagonista de MIF, ISO-1 (100 µg/mL) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (Al-Abed *et al.*, 2005) por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1C). Após o período indicado, todos os ensaios foram analisados (Figura 1D).

4.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA (ELISA)

A dosagem da secreção de citocinas humanas (TGF-β1, IL-4, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-12p40, IL-8 e MIF) (BD Biosciences, San Diego, EUA; R&D Systems, Minneapolis, EUA) no sobrenadante das células HTR-8/SVneo e HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e/ou estimuladas pela co-cultura como descrito no item 4.3 foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes.

Resumidamente, as placas de alta afinidade para ELISA com 96 poços (Corning Corstar Corp., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específicos por 12 h. Seguido esse período, as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS)-*Tween* (PBS-T 0,05%) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS mais 1% Soro Albumina Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para MIF ou PBS mais 10% de SBF para as demais citocinas) em temperatura ambiente por 1 h.

Para o ensaio de detecção de TGF-β1, as amostras foram primeiramente ativadas e neutralizadas com soluções de ácido e base, uma vez que TGF-β1 é secretado pelas células como um complexo inativo. Assim, foram adicionadas aos 50 µl das amostras 2 µL de HCl 1N por 1 h e, posteriormente, foram adicionados 2 µL de NaOH 1N para neutralizar a ação do ácido.

Após lavagem das placas com PBS-T, 50 µL das amostras ativadas ou não foram adicionadas, e paralelamente, curvas padrões foram adicionadas em duplicata com diluições seriadas e incubadas a temperatura ambiente por mais 2 h. As curvas das citocinas foram realizadas de 8000 pg/mL a 125 pg/mL para TGF-β1; 500 pg/mL a 7,8 pg/mL para IL-4, IL-10 e TNF-α; 300 pg/mL a 4,7 pg/mL para IFN-γ e IL-6; 2000 pg/mL a 31,3 pg/mL para IL-12p40; 200

pg/mL a 3,1 pg/mL para IL-8; e 4000 pg/mL a 62,5 pg/mL para MIF. Em seguida, as placas foram lavadas e a placa para detecção de MIF foi incubada com anticorpo de detecção biotilado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 h e incubada com estreptavidina-peroxidase em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 20 min. As outras placas para detecção das demais citocinas foram incubadas com anticorpo de detecção biotilado conjugado com estreptavidina-peroxidase em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h. A seguir as placas foram novamente lavadas, foi adicionado 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, EUA) e a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm (Titertek Multiskan Plus, Vancouver, EUA). Os valores da DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA).

4.5. ENSAIO DE INVASÃO

As células HTR-8/SVneo 24 h após o período em co-cultura, conforme descrito no item 4.3, foram removidas das placas de 6 poços, plaqueadas (3×10^4 células/100 μ L de meio a 1% FBS) na câmara superior dos insertos de *transwell* para placas de 24 poços (membrana de policarbonato com 6,5 mm de diâmetro e poros de 8,0 μ m) (Corning Corning Corp., Massachusetts, EUA) previamente cobertos com 10 μ L de Matrigel com Fator de Crescimento Reduzido (BD Biosciences, San Diego, EUA) e foram tratadas ou não com ISO-1 (100 μ g/mL). Esses insertos de *transwell* foram colocados em placas de 24 poços contendo meio completo (500 μ L/poço) por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 1C). Após esse período, a superfície superior da membrana de policarbonato foi limpa com um cotonete úmido, para remoção do excesso de Matrigel e as células que não invadiram. As células da parte inferior da membrana que invadiram foram fixadas com formol 10% em PBS a 4°C por 10 min. Após lavagens com PBS, as células foram coradas com cristal de violeta 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em temperatura ambiente por 5 min, foram novamente lavadas, incubadas com ácido acético 33% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em temperatura ambiente por 10 min sob agitação e a DO foi determinada em leitor de placas a 570 nm (Titertek Multiskan Plus, Vancouver, EUA) (Figura 1D).

4.6. ENSAIO DE MIGRAÇÃO

As células HTR-8/SVneo foram submetidas ao ensaio de *scratch*, baseado na interrupção da monocamada celular, estabelecido conforme Liang e colaboradores (2007), para determinação da porcentagem de ocupação das células. Células HTR-8/SVneo confluentes após 24 h ao período em co-cultura, conforme descrito no item 4.3, tiveram a monocamada de células interrompida com um traço em linha reta, na posição vertical, realizado com a utilização de uma ponteira de 200 µL, em meio contendo 1% SBF. Em seguida, foi obtida a captura da imagem (0 h) a partir do traçado realizado, orientada pela marcação de dois pontos de referência em cada condição experimental na parte externa da placa criado no momento da captura (Figura 1C). Após 24 h, a 37°C e 5% de CO₂, uma nova imagem foi capturada (24 h) (Figura 1D), tendo como ponto de referência as marcações estabelecidas durante a captura das primeiras imagens no tempo 0 h. As imagens dos pontos pré-estabelecidos capturadas pelo microscópio Evos (MillCreek, Washington, EUA), foram analisadas através da largura da área da monocamada interrompida mensurada utilizando um programa de processamento de imagens (Image J, National Institutes of Health, EUA). Os resultados obtidos a partir do cálculo da taxa de migração foram expressos como porcentagem de ocupação em relação à média da taxa de migração do controle (células não estimuladas).

$$\text{TAXA DE MIGRAÇÃO} = \frac{\text{ÁREA ORIGINAL (0 h)} - \text{ÁREA FINAL (24 h)}}{\text{ÁREA ORIGINAL (0 h)}}$$

$$\text{PORCENTAGEM DE OCUPAÇÃO} = \frac{\text{TAXA DE MIGRAÇÃO} \times 100\%}{\text{MÉDIA DA TAXA DE MIGRAÇÃO DO CONTROLE}}$$

4.7. ENSAIO DE DETECÇÃO DE APOPTOSE

O índice de apoptose foi mensurado utilizando o kit de Detecção de Apoptose FITC Anexina V de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA). Brevemente, as células HTR-8/SVneo 24 h após o período em co-cultura, conforme descrito no item 4.3, foram tratadas ou não com ISO-1 (100 µg/mL) por adicionais 24 h, a 37°C e 5% de CO₂ (Figura 1C). Em seguida, as células foram removidas das placas, lavadas com PBS gelado, transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 400 x g por 5 min. As células foram

homogeneizadas com o tampão de ligação (BD Biosciences, San Diego, EUA), a concentração celular foi ajustada para 1×10^5 células/100 μL e foram transferidas para tubos de poliestireno de 15x75 mm (BD Biosciences, San Diego, EUA). Foram adicionados 5 μL de FITC/Anexina V e/ou 5 μL da solução de marcação Iodeto de Propídio, então as células foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 min. Após a dupla marcação, foi adicionado o tampão de ligação e a fluorescência de 20.000 células de cada condição experimental foi analisada pelo citômetro FACSCalibur BD™ (BD Company, San Diego, EUA) dentro de 1h (Figura 1D).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata e as diferenças entre os grupos foram avaliados pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de *Bonferroni* ou de *Dunn*. A análise estatística foi determinada usando o programa GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) e as diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS HTR-8/SVneo E HUVEC MODULA A SECREÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes das células HUVEC foram investigados para avaliar se a interação com as células HTR-8/SVneo durante a co-cultura ou somente a infecção por *T. gondii* modificaria o perfil de citocinas secretadas pelas células endoteliais. Assim, as células HUVEC infectadas, independentemente do estímulo pela co-cultura, e as células HUVEC não infectadas e estimuladas com células HTR-8/SVneo apresentaram uma maior secreção de MIF em comparação com as células HUVEC não infectadas e não estimuladas pela co-cultura (controle) (Figura 2A). Interessantemente, a infecção das células HUVEC e o estímulo com as células HTR-8/SVneo durante a co-cultura foram capazes de aumentar sinergicamente a secreção de MIF pelas células endoteliais quando comparadas com as células HUVEC infectadas e não estimuladas (Figura 2A).

Os sobrenadantes das células HTR-8/SVneo foram investigados para avaliar se a interação com as células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, durante ou após a co-cultura modificaria o perfil de citocinas secretadas pelas células trofoblásticas. Dessa forma, as células HTR-8/SVneo durante a co-cultura com células HUVEC, independentemente da infecção, apresentaram uma menor secreção de MIF (Figura 2B), mas uma maior secreção de IL-6 (Figura 2C) e IL-8 (Figura 2D) quando comparadas ao respectivo controle (células HTR-8/SVneo não estimuladas).

Após a co-cultura (24 h após a interação com as células HUVEC), as células HTR-8/SVneo que estiveram em co-cultura com células HUVEC não infectadas mantiveram a menor secreção de MIF em comparação ao seu respectivo controle (Figura 2B). No entanto, uma maior secreção de MIF no sobrenadante das células trofoblásticas foi observada quando essas células HTR-8/SVneo estiveram em co-cultura com células HUVEC infectadas em comparação às células HTR-8/SVneo que estiveram em co-cultura com células HUVEC não infectadas e em comparação às células HTR-8/SVneo estimuladas durante a co-cultura com células HUVEC infectadas (Figura 2B). Adicionalmente, as células HTR-8/SVneo mantiveram maiores índices de secreção de IL-6 em comparação ao respectivo controle das condições após a co-cultura, porém esses índices foram menores quando comparadas às respectivas condições durante a co-cultura, independentemente da infecção das células endoteliais HUVEC (Figura 2C). Em relação

à secreção de IL-8 pelas células trofoblásticas que estiveram em co-cultura com as células endoteliais, não foram observadas diferenças significativas quando comparados ao respectivo controle, porém, a secreção de IL-8 pelas células HTR-8/SVneo que estiveram co-cultivadas com as células HUVEC infectadas ou não se mostrou diminuída quando comparadas às respectivas condições durante a co-cultura (Figura 2D). Ainda assim, também não foram observadas diferenças significativas para a secreção das citocinas TGF- β 1, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12p40 e IL-6, IL-8 (secretados pelas células HUVEC).

5.2. CÉLULAS HUVEC INFECTADAS E O TRATAMENTO COM ISO-1 ALTERAM A CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS HTR-8/SVneo

Para determinar a influência das células endoteliais na invasão de células trofoblásticas, as células HTR-8/SVneo foram co-cultivadas com células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii*. Após a co-cultura com as células HUVEC não infectadas, as células HTR-8/SVneo estimuladas tiveram a capacidade de invasão diminuída em comparação ao controle (células HTR-8/SVneo não estimuladas). No entanto, o estímulo com células HUVEC infectadas aumentou a capacidade invasiva de células trofoblásticas em relação às células HTR-8/SVneo que foram co-cultivadas com células HUVEC não infectadas (Figura 3).

Observamos também que o tratamento com ISO-1 das células HTR-8/SVneo, após a co-cultura com células HUVEC infectadas reduziu a capacidade invasiva das células trofoblásticas quando comparadas às células HTR-8/SVneo estimuladas com células HUVEC não infectadas e tratadas com ISO-1. Além disso, na condição em que as células HTR-8/SVneo foram co-cultivadas com as células HUVEC não infectadas e tratadas com ISO-1 notou-se um aumento da capacidade invasiva de células trofoblásticas em relação ao respectivo controle (células HTR-8/SVneo não estimuladas e tratadas com ISO-1). O tratamento com ISO-1 foi capaz de alterar os eventos relacionados à atividade invasiva das células HTR-8/SVneo quando comparados à cada condição respectiva sem tratamento com ISO-1 (Figura 3).

5.3. CÉLULAS HUVEC INFECTADAS DIMINUÍRAM A CAPACIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS HTR-8/SVneo

Para determinar a influência das células endoteliais na migração de células trofoblásticas, as células HTR-8/SVneo foram co-cultivadas com as células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii*. A capacidade migratória das células HTR-8/SVneo aumentou após o

estímulo com as células HUVEC não infectadas em comparação ao controle (células não estimuladas). Entretanto, diminuiu após o estímulo das células trofoblásticas com as células HUVEC infectadas em relação ao controle e as células HTR-8/SVneo que foram co-cultivadas com as células HUVEC não infectadas (Figura 4A). As fotomicrografias representativas dos pontos selecionados de cada condição experimental foram comparadas entre os tempos 0 h e 24 h após a interrupção da monocamada. (Controle (0 h: Figura 4B e 24 h: Figura 4C), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC (0 h: Figura 4D e 24 h: Figura 4E), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas (0 h: Figura 4F e 24 h: Figura 4G)).

5.4. CÉLULAS HUVEC INFECTADAS E O TRATAMENTO COM ISO-1 ALTERAM A O ÍNDICE DE MORTE CELULAR DAS CÉLULAS HTR-8/SVneo

Para determinar se haveria influência das células endoteliais na morte de células trofoblásticas, as células HTR-8/SVneo foram estimuladas com as células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii*. Não foram observadas diferenças significativas no índice de morte celular pelas células HTR-8/SVneo não estimuladas (controle) em comparação com as células HTR-8/SVneo que estiveram em interação com as células HUVEC infectadas ou não. Por outro lado, as células HTR-8/SVneo após a co-cultura com as células HUVEC infectadas aumentaram a porcentagem de morte celular em relação às células HTR-8/SVneo que foram co-cultivadas com as células HUVEC não infectadas (Figura 5A).

Entretanto, quando as células HTR-8/SVneo que estiveram em co-cultura com células HUVEC infectadas foram tratadas com ISO-1 apresentaram uma menor porcentagem de morte celular quando comparadas às células HTR-8/SVneo estimuladas com células HUVEC não infectadas e tratadas com ISO-1. Além disso, o tratamento com ISO-1 aumentou a porcentagem de morte celular das células HTR-8/SVneo quando comparados à cada condição respectiva sem tratamento com ISO-1 (Figura 5A). Gráficos em dot plots representativos da exposição de fosfatidilserina das condições: Controle (Figura 5B), Controle [ISO-1] (Figura 5C), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC (Figura 5D), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC [ISO-1] (Figura 5E), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas (Figura 5F) e Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas [ISO-1] (Figura 5G).

6. DISCUSSÃO

A placentação é um pré-requisito para a sobrevivência do embrião de mamíferos, uma vez que garante o suporte endócrino, nutricional, imunológico e também o aporte de oxigênio adequado para o desenvolvimento do feto (Velicky *et al.*, 2016). A interação entre as células trofoblásticas com as células endoteliais uterinas apresenta um importante papel na placentação, uma vez que promove a vasculogênese (Gude *et al.*, 2004). Por um longo período, foi proposto que células trofoblásticas invadiam apenas artérias espiraladas enquanto todas as outras estruturas presentes na parede do útero eram ignoradas (Moser *et al.*, 2018) e por esse motivo, o contato e a invasão das veias decíduais por células trofoblásticas eram desconsiderados (Red-Horse *et al.*, 2005). Apenas recentemente, a invasão de veias uterinas por células trofoblásticas tem sido discutida (He *et al.*, 2017; Moser *et al.*, 2017; Moser; Huppertz, 2017). Uma adequada vascularização materno-placentária ocorre quando há conexão entre veias e artérias decíduais com o espaço intervilosos. Este processo é essencial, uma vez que permite que o sangue materno, derivado das artérias espiraladas, circule entre os vilos placentários e retorne para o corpo da mãe via veias decíduais (Velicky *et al.*, 2016). A perfusão insuficiente da placenta resulta em complicações gestacionais, como síndrome do crescimento intrauterino e pré-eclâmpsia (Fisher, 2015). O aborto espontâneo recorrente associa-se com um menor índice de invasão de células trofoblásticas extravilosas em veias e vasos linfáticos (Windsperger *et al.*, 2017). Entretanto, existem poucos estudos que se ocupem em desvendar as interações entre células trofoblásticas extravilosas e células endoteliais venosas. A correta perfusão vascular que se estabelece em uma placenta funcionalmente saudável é também dependente das interações de células trofoblásticas extravilosas e o endotélio venoso. Neste sentido, nosso estudo assume um caráter inovador especialmente no curso da infecção por *T. gondii* neste microambiente.

Em uma gestação de sucesso existe uma produção balanceada de fatores pró e anti-angiogênicos atuando de maneira autócrina e parácrina, mas a desregulação dessa resposta imune, que pode ser desencadeada por patógenos, geralmente está associada ao insucesso gestacional (Mor *et al.*, 2017). Neste trabalho, a infecção das células HUVEC por *T. gondii*, assim como a interação com as células HTR-8/SVneo, sinergicamente induziram maiores produções de MIF por células HUVEC. MIF é uma importante citocina envolvida na reprodução, e apresenta um papel crítico durante a infecção, uma vez que os níveis de MIF no

espaço interviloso é maior do que no sangue materno e no cordão umbilical e estes níveis são ainda maiores no curso de infecções como a malária (Singh *et al.*, 2012). Estudos prévios do nosso grupo também demonstraram a importância de MIF no controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal (Ferro *et al.*, 2008; de Oliveira Gomes *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2018). O nosso grupo também demonstrou que a produção de MIF diminui a proliferação de *T. gondii* em células trofoblásticas (Barbosa *et al.*, 2014). Além deste importante papel, é sabido que MIF é necessário na regulação da expressão de importantes moléculas na resposta imunológica e que controla, com sucesso, infecções como a leishmaniose, a tripanossomíase, a neosporose, a coccidiose, a meningoencefalite, além da toxoplasmose (Rosado; Rodriguez-Sosa, 2011).

Nossos resultados mostraram que a secreção da citocina MIF pelas células HUVEC foi aumentada na presença das células HTR-8/SVneo. Estes resultados demonstram que a interação entre células endoteliais e células trofoblásticas orquestram o necessário perfil imunológico e angiogênico na interface materno fetal. Demonstramos que as células HTR-8/SVneo secretaram baixos níveis de MIF na presença de células HUVEC infectadas, provavelmente como forma de controlar as concentrações exageradas de MIF por células HUVEC infectadas. MIF é uma citocina chave envolvida na resposta inflamatória associada à pré-eclâmpsia (Cardaropoli *et al.*, 2012) e foi detectada em níveis exacerbados no soro materno e em tecidos placentários de pacientes com pré-eclâmpsia (Todros *et al.*, 2005; Cardaropoli *et al.*, 2012). Por outro lado, a presença de *T. gondii* nas condições infectadas utilizadas durante a co-cultura, também pode ter sido responsável pelos menores índices da produção de MIF pelas células HTR-8/SVneo, uma vez que os níveis de MIF são importantes para sua própria sobrevivência, mas o excesso induziria uma resposta controle contra infecções. Nas condições de ausência do sobrenadante de células HUVEC infectadas e 24 horas após a co-cultura, células HTR-8/SVneo aumentaram a secreção da citocina MIF. Provavelmente, a ausência dos níveis exacerbados secretados pelas células infectadas durante a co-cultura pode ter induzido a secreção de MIF pelas células HTR8/SVneo no sentido de compensar a falta dessa citocina e contribuir para uma manutenção adequada do microambiente próinflamatório necessário contra a infecção por *T. gondii*.

A implantação do embrião humano e o início da placentação é orquestrado por uma ampla variedade de fatores solúveis próinflamatórios secretados por inúmeras subpopulações de células da interface materno-fetal (Salamonsen *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2013) e o distúrbio

da produção desses fatores pode causar complicações gestacionais ou aborto (Salamonsen *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2011; Mor *et al.*, 2017). IL-6, IL-8 e MIF são citocinas próinflamatórias importantes na imunofisiologia da reprodução, uma vez que são secretados por células trofoblásticas (Jauniaux *et al.*, 1996; Hanna *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2014), pela decídua, por tecidos placentários (Saito *et al.*, 1994; Jauniaux *et al.*, 1996) e explantes vilosos (Ferro *et al.*, 2008; de Oliveira Gomes *et al.*, 2011). Essas citocinas são também fundamentais no remodelamento vascular e induzem atividades reguladoras no processo de implantação embrionária (de Oliveira *et al.*, 2010; Prins *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2013; Bevilacqua *et al.*, 2014; Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015). Nesse sentido, camundongos deficientes na produção de IL-6 apresentaram uma fertilidade reduzida e menores quantidades de sítios de implantação viáveis (Robertson *et al.*, 2000). Adicionalmente, mulheres com pré-eclâmpsia apresentaram maiores níveis de IL-8 no soro materno levando a uma invasão deficiente (Ahn *et al.*, 2011). Em acordo com nossos resultados, nas condições em que as células HUVEC estiveram presentes, independentemente da infecção, níveis mais elevados de IL-6 e IL-8 produzidos pelas células HTR-8/SVneo, quando comparados ao controle, foram observados.

A invasão, a migração e a apoptose são algumas das funções biológicas de células trofoblásticas. Estes processos são controlados por inúmeras atividades cooperativas entre as células trofoblásticas, endoteliais e deciduais necessárias para estabelecer a ancoragem da placenta à decídua e o remodelamento da vasculatura uterina (Velicky *et al.*, 2016; Choudhury *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, células HTR-8/SVneo demonstraram uma invasão reduzida após a co-cultura com células HUVEC em comparação às condições controle. É interessante notar que, apesar da invasão pelos trofoblastos ser essencial para uma placentação adequada, a atividade invasiva dessas células deve ser rigorosamente controlada e fatores parácrinos, provenientes de células vizinhas, podem estar envolvidos nesse controle. Nesse sentido, ao mesmo tempo em que células trofoblásticas extravilosas atingem o seu potencial invasivo, por meio da produção de metaloproteínases de matriz (MMP), inibidores teciduais dessas metaloproteínases (TIMP) são secretados para antagonizar e limitar a invasão (Sharma *et al.*, 2016).

Uma má adaptação da resposta imune na interface materno-fetal também apresenta um importante relação na placentação inadequada e inúmeras citocinas e quimiocinas são cruciais na modulação local da resposta imune (Yeh *et al.*, 2013). Estes dados nos fazem

acreditar que diferentes concentrações de MIF podem alterar a capacidade invasiva das células trofoblásticas observado em nossos resultados. Células HTR-8/SVneo, após a co-cultura com células HUVEC, apresentaram menores níveis de MIF e reduzido potencial invasivo, por outro lado, a co-cultura com as células HUVEC infectadas induziram maiores níveis da secreção de MIF e um maior potencial invasivo pelas células trofoblásticas. Dados contrários foram observados nessas mesmas condições quando a citocina MIF foi neutralizada pelo seu antagonista ISO-1, e a neutralização de MIF nas condições de maior representatividade diminuiu o potencial invasivo das células trofoblásticas. Notavelmente, a presença de MIF na gestação e a infecção por *T. gondii* podem estar envolvidas com a capacidade invasiva das células trofoblásticas, uma vez que MIF significativamente estimula a invasão de citotrofoblastos e células HTR-8/SVneo, enquanto a neutralização de MIF endógeno apresenta um efeito inibitório (Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015). Uma menor atividade invasiva de células trofoblásticas, e falhas no remodelamento vascular, assim como uma excessiva invasão pelas células trofoblásticas estão envolvidos em complicações gestacionais (Sharma *et al.*, 2016). A interação entre as células trofoblásticas e as células HUVEC infectadas, durante a co-cultura, manteve a secreção de MIF reduzida pelas células vizinhas, HTR-8/SVneo, e esse resultado pode ter sido induzido pelo parasito no sentido de escapar da resposta imune em condições *in vitro*; provavelmente fato semelhante poderia estar envolvido no curso da implantação embrionária.

A invasão pelo trofoblasto é um processo de várias etapas que envolvem a adesão aos componentes da matriz extracelular, degradação e migração pelo tecido conjuntivo erodido (Halasz *et al.*, 2013). Além disso, estudos atuais detectaram trofoblastos extravilosos no interior de veias uterinas (He *et al.*, 2017; Moser *et al.*, 2017; Moser; Huppertz, 2017; Moser *et al.*, 2018) e foi observado que vasos venosos apresentavam significativamente mais trofoblastos extravilosos intraluminal (dentro do lúmen de vasos decíduais) do que em vasos arteriais, os quais geralmente estiveram associados com um alto número de trofoblastos extravilosos intramural (próximos à camada intacta de células endoteliais) (Windsperger *et al.*, 2017). Nossos dados demonstram que células trofoblásticas extravilosas HTR-8/SVneo, após a co-cultura com as células HUVEC, apresentaram uma maior capacidade migratória do que o controle e, após a co-cultura com as células HUVEC infectadas, as células HTR-8/SVneo reduziram sua capacidade de migração. A influência na migração pelos trofoblastos pode estar associado à mudanças alternativas de sinais quimiotáticos, durante a infecção e a co-cultura

com células endoteliais, estimulando ou não a migração de células trofoblásticas. A migração pelos trofoblastos é dependente da interação entre as células endoteliais e trofoblásticas e aparenta estar acompanhada por mudanças na expressão de proteases, caderinas e integrinas (Damsky *et al.*, 1992; Damsky *et al.*, 1994), mas o mecanismo de regulação permanece desconhecido. A migração de células trofoblásticas *in vitro* pode ser regulado por IL-6 (Jovanović; Vićovac, 2009), IL-8 (Jovanović *et al.*, 2010), TGF- β (Irving *et al.*, 1995) e MIF (Jovanović Krivokuća *et al.*, 2015). MIF estimula significativamente a migração por células HTR-8/SVneo, enquanto o tratamento com ISO-1 diminui essa capacidade migratória, de acordo com Jovanović Krivokuća e colaboradores (2015). Controversamente em nosso trabalho, condições infectadas, que induziram os maiores níveis da produção de MIF pelas células HTR-8/SVneo, demonstraram uma capacidade de migração reduzida e é possível que outros fatores mediadores podem ter inibido a migração pelas células trofoblásticas sobrepondo os efeitos de MIF. Notavelmente, as células trofoblásticas receberam variados fatores derivados da co-cultura com as células HUVEC e nesse caso a citocina de maior expressão não é o único fator que pode alterar essa função biológica. Essa hipótese, também pode explicar o resultado diferente obtido por Jovanović Krivokuća e colaboradores (2015) em que de acordo com sua condição experimental, as células trofoblásticas receberam o estímulo isolado com rhMIF, onde foi analisado a ação direta e isolada dessa citocina na capacidade migratória de células trofoblásticas. Além disso, a infecção por *T. gondii*, no primeiro momento, pode alterar a expressão de vários fatores durante a co-cultura, interferindo conseqüentemente em funções biológicas posteriores. Estudos futuros são necessários para corroborar essa hipótese.

Durante uma gestação normal, a apoptose tem sido detectada na placenta e apresenta um importante papel ao eliminar células desnecessárias ou disfuncionais, mantendo uma função normal do tecido. Esse processo ativo está associado com a invasão de trofoblastos extravilosos intersticiais e endovasculares, no entanto, um alto índice de apoptose nos vilos e de trofoblastos extravilosos tem sido observado em placentas de grávidas com pré-eclâmpsia. O aumento da apoptose de trofoblastos no início da gestação pode limitar a invasão pelos trofoblastos extravilosos e contribuir para patologias durante o período gestacional (Ahn *et al.*, 2011). De acordo com nossos resultados, nenhuma diferença significativa do índice de morte celular foi observado pelas células HTR-8/SVneo influenciadas pela co-cultura com as células HUVEC, uma vez que qualquer alteração desse índice comprometeria uma gravidez normal de sucesso. A apoptose é também reconhecida como um importante mecanismo de

defesa contra infecções parasitárias e pode ser igualmente iniciada ou diminuída pelo parasito, contribuindo para sua própria sobrevivência, e prevenindo a resposta imune de ataque do hospedeiro (Lüder *et al.*, 2001). Estudos prévios demonstraram que a incidência de apoptose em células de linhagem BeWo infectadas pela cepa RH de *T. gondii* tiveram menores índices de apoptose indicando que cepas de tipo I podem ser capazes de inibir a apoptose em células hospedeiras (Angeloni *et al.*, 2009). Nossos dados demonstram que células HTR-8/SVneo apresentaram maiores níveis do índice de morte celular após o estímulo com células HUVEC infectadas e, possivelmente, este resultado pode ter sido induzido pelas células endoteliais infectadas no sentido de promover a apoptose de células vizinhas e evitar a resposta imune do hospedeiro favorecendo a sobrevivência do parasito. Nas condições em que as células HTR-8/SVneo foram co-cultivadas com as células HUVEC infectadas também foram observados maiores índices da secreção de MIF pelas células trofoblásticas, apesar da relação entre MIF e a apoptose não ser consensual. Em nosso estudo, quando essa condição teve a citocina MIF neutralizada por ISO-1, menores índices de morte celular foram observados em comparação com as células trofoblásticas que foram co-cultivadas com as células endoteliais não infectadas, responsáveis por menores níveis da secreção de MIF. Vários estudos demonstraram o papel de MIF relacionado à sobrevivência celular na supressão da apoptose e outros mecanismos distintos (Calandra *et al.*, 2003; Ietta *et al.*, 2018); entretanto, outros estudos demonstraram que elevadas concentrações de MIF está predominantemente associadas à indução da apoptose em diferentes tipos celulares (Saksida *et al.*, 2012; Stojanovic *et al.*, 2012). Barbosa e colaboradores (2014) verificaram que a fosforilação de ERK 1/2 foram dependentes da concentração de MIF em células BeWo, mas apenas as baixas concentrações de MIF foram capazes de ativar a fosforilação de ERK 1/2. Dados prévios do nosso grupo, demonstraram que a indução diferenciada de apoptose observada após a infecção com diferentes cepas de *T. gondii* esteve associada com o aumento da fosforilação de ERK 1/2 (Angeloni *et al.*, 2013) e a fosforilação de ERK 1/2 está relacionada à funções anti-apoptóticas (Calandra *et al.*, 2003). Uma vez que altas concentrações de MIF reduzem a fosforilação de ERK 1/2 (Lue *et al.*, 2006), uma alternativa via de sinalização intracelular pode ser ativada por MIF, e assim, essa citocina ao ser endocitada e translocada através da membrana endosomal (Kleemann *et al.*, 2000), pode explicar a indução da apoptose diante de elevadas concentrações de MIF. No entanto, estudos futuros são necessários para verificar essa hipótese.

De forma geral, o estudo presente revela, através de um modelo *in vitro* de sistema em co-cultura, que a comunicação intercelular entre células trofoblásticas extravilosas e células endoteliais venosas foi modulado pela infecção por *T. gondii*. Um modelo hipotético da interação entre essas células foi proposto e mostrou que as células HTR-8/SVneo, co-cultivadas com as células HUVEC, independentemente da infecção, e em resposta aos fatores secretados pelas células endoteliais, produziram altos níveis das citocinas IL-6 e IL-8, e reduziram os níveis da secreção de MIF quando comparados ao controle. Após 24 horas de co-cultura, os índices de secreção de IL-6 permaneceram alteradas em relação ao controle, no entanto, a infecção por *T. gondii* das células endoteliais promoveram uma elevada produção de MIF pelas células HTR-8/SVneo. Possivelmente, a indução da produção de MIF pelas células HTR-8/SVneo pode ser o fator, não isolado, responsável por alterar a função das células trofoblásticas. No entanto, o aumento da invasão, o menor índice de migração e a maior taxa de morte celular poderia acarretar consequências negativas para o desenvolvimento fetal, caso a infecção materna por *T. gondii* seja adquirida durante os períodos iniciais da gestação (Fig. 6). Nossos resultados demonstram claramente a influência que a infecção por *T. gondii* causa no perfil de produção de citocinas orquestrado pela relação entre as células materno-fetais podendo ser crítica para o resultado da toxoplasmose congênita.

7. CONCLUSÕES

7.1. CONCLUSÃO GERAL

A interação entre células trofoblásticas extravilosas humanas (HTR-8/SVneo) com células endoteliais venosas humanas (HUVEC), infectadas ou não por *T. gondii*, foi responsável pela alteração da invasão, a migração e a morte celular das células trofoblásticas.

7.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- A interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, alterou a secreção de citocinas por ambas linhagens celulares;
- A interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC infectadas por *T. gondii*, aumentou a capacidade invasiva das células trofoblásticas;
- A interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas por *T. gondii*, e o tratamento com ISO-1, diminuiu a capacidade invasiva das células trofoblásticas;
- A interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas por *T. gondii*, diminuiu a capacidade migratória das células trofoblásticas;
- A interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas por *T. gondii*, aumentou o índice de morte celular das células trofoblásticas;
- A interação entre células HTR-8/SVneo e células HUVEC, infectadas por *T. gondii*, e o tratamento com ISO-1, alterou o índice de morte celular das células trofoblásticas;

8. FIGURAS

FIGURA 1. Esquema da co-cultura entre células trofoblásticas extravilosas humanas e células endoteliais humanas, infectadas ou não por *T. gondii*, e a influência dessa interação em funções trofoblásticas. **(A)** No DIA 1, as células HTR-8/SVneo foram plaqueadas em placas de 6 poços e as células HUVEC foram mantidas em frascos de cultura e infectadas ou não com *T. gondii*. Ambas as células foram mantidas em meio completo por 24 h. **(B)** Após a confluência das mesmas, no DIA 2, o meio completo foi substituído e insertos de *transwell* foram adicionados ou não (controle (HTR-8/SVneo)) nos poços. Células HUVEC infectadas ou não foram plaqueadas na câmara superior dos insertos de *transwell* e foram mantidas em meio completo por adicionais 24 h. **(C)** No DIA 3, os sobrenadantes provenientes da co-cultura, condições nomeadas como co-cultura, foram armazenados em -80°C, o meio completo foi substituído e as células HTR-8/SVneo foram usadas nos ensaios de invasão ou migração. Os insertos de *transwell*, contendo as células HUVEC infectadas ou não, foram removidas e realocadas para outras placas, sem a influência das células HTR-8/SVneo. **(D)** Depois de 24 h, no DIA 4, os sobrenadantes, agora nomeados “após co-cultura”, foram coletados e estocados para futuras análises por ensaios de detecção de citocinas. Os ensaios de invasão/migração, iniciados no DIA 3, foram analisadas ou as células foram utilizadas para o ensaio de detecção de morte celular.

FIGURA 1

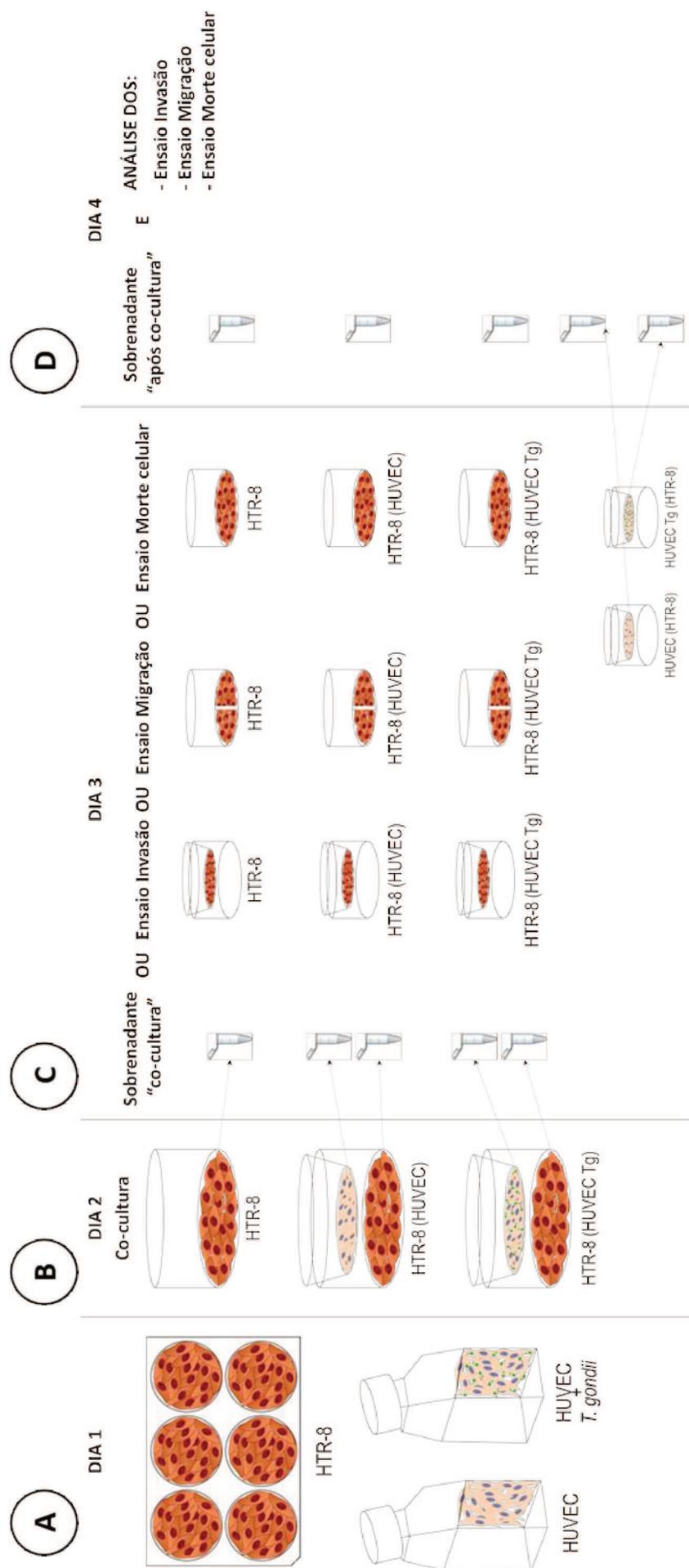


FIGURA 2. Detecção da secreção de citocinas pelas células HUVEC e HTR-8/SVneo. **(A)** Secreção de MIF pelas células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, durante a co-cultura com células HTR-8/SVneo ou na ausência da influência pelas células trofoblásticas. **(B-D)** Secreção de citocinas pelas células HTR-8/SVneo estimuladas pelas células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*, a partir dos sobrenadantes coletados durante a “Co-cultura” e “Após co-cultura”, secretados 24 h após a influência pelas células HUVEC. A secreção das citocinas MIF, **(A-B)**, IL-6 **(C)** e IL-8 **(D)** foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/mL. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. (*) Comparação entre as células não infectadas e não estimuladas (HTR-8/SVneo ou HUVEC) com as outras condições dentro do mesmo grupo. (#) Comparação entre as condições infectadas (HUVEC Tg (HTR-8) ou HTR-8 (HUVEC Tg)) com as condições não infectadas (HUVEC (HTR-8) ou HTR-8 (HUVEC)) do mesmo grupo. (\$) Comparação entre as mesmas condições em grupos diferentes ($P < 0.05$).

FIGURA 2

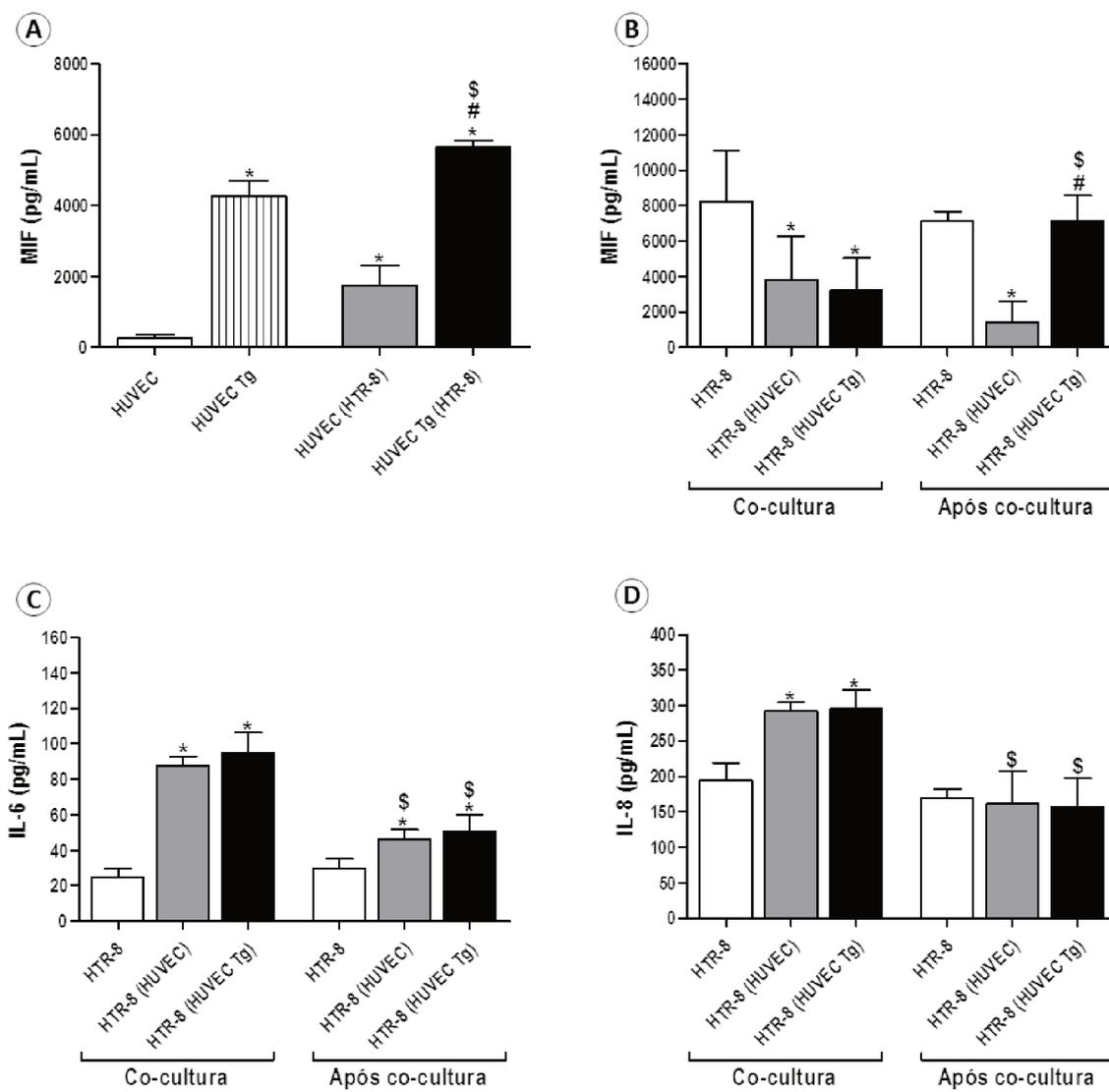


FIGURA 3. Avaliação da capacidade invasiva de células HTR-8/SVneo após a co-cultura com células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*. A invasão pelas células HTR-8/SVneo através do Matrigel nos insertos de *transwell* foram mensurados pela densidade óptica. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. (*) Comparação entre as células não infectadas e não estimuladas (HTR-8/SVneo ou HTR-8 [ISO-1]) com as outras condições dentro do mesmo grupo. (#) Comparação entre as condições infectadas (HTR-8 (HUVEC Tg) ou HTR-8 (HUVEC Tg) [ISO-1]) com as condições não infectadas (HTR-8 (HUVEC) ou HTR-8 (HUVEC) [ISO-1]) do mesmo grupo. (\$) Comparação entre as mesmas condições em grupos diferentes ($P < 0.05$).

FIGURA 3

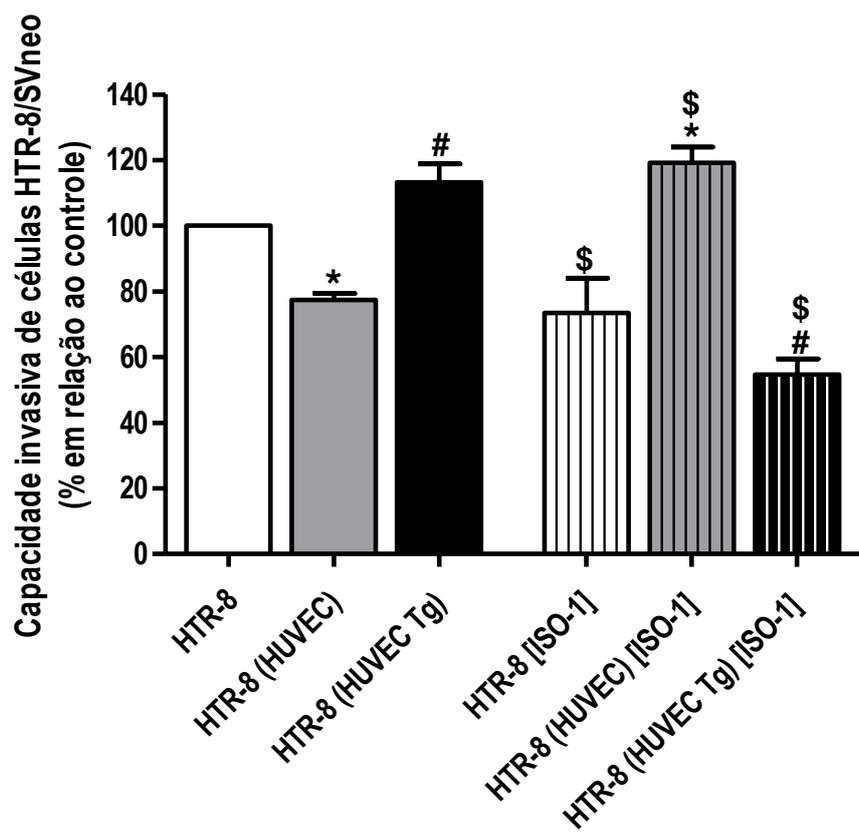


FIGURA 4. Avaliação da capacidade migratória de células HTR-8/SVneo após a co-cultura com células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii*. A migração pelas células HTR-8/SVneo foram mensuradas pela relação da largura da área da monocamada interrompida dos pontos pré-selecionados nas condições no tempo 0 h (Controle **(B)**, Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC **(D)**, Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas **(F)**) e após 24 h (Controle **(C)**, Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC **(E)**, Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas **(G)**). **(B-G)** Fotomicrografias representativas das condições acima descritas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas *Bonferroni*. (*) Comparação entre as células não infectadas e não estimuladas (HTR-8/SVneo) com as outras condições dentro do mesmo grupo. (#) Comparação entre as condições infectadas (HTR-8 (HUVEC Tg)) com as condições não infectadas (HTR-8 (HUVEC)) do mesmo grupo ($P < 0.05$).

FIGURA 4

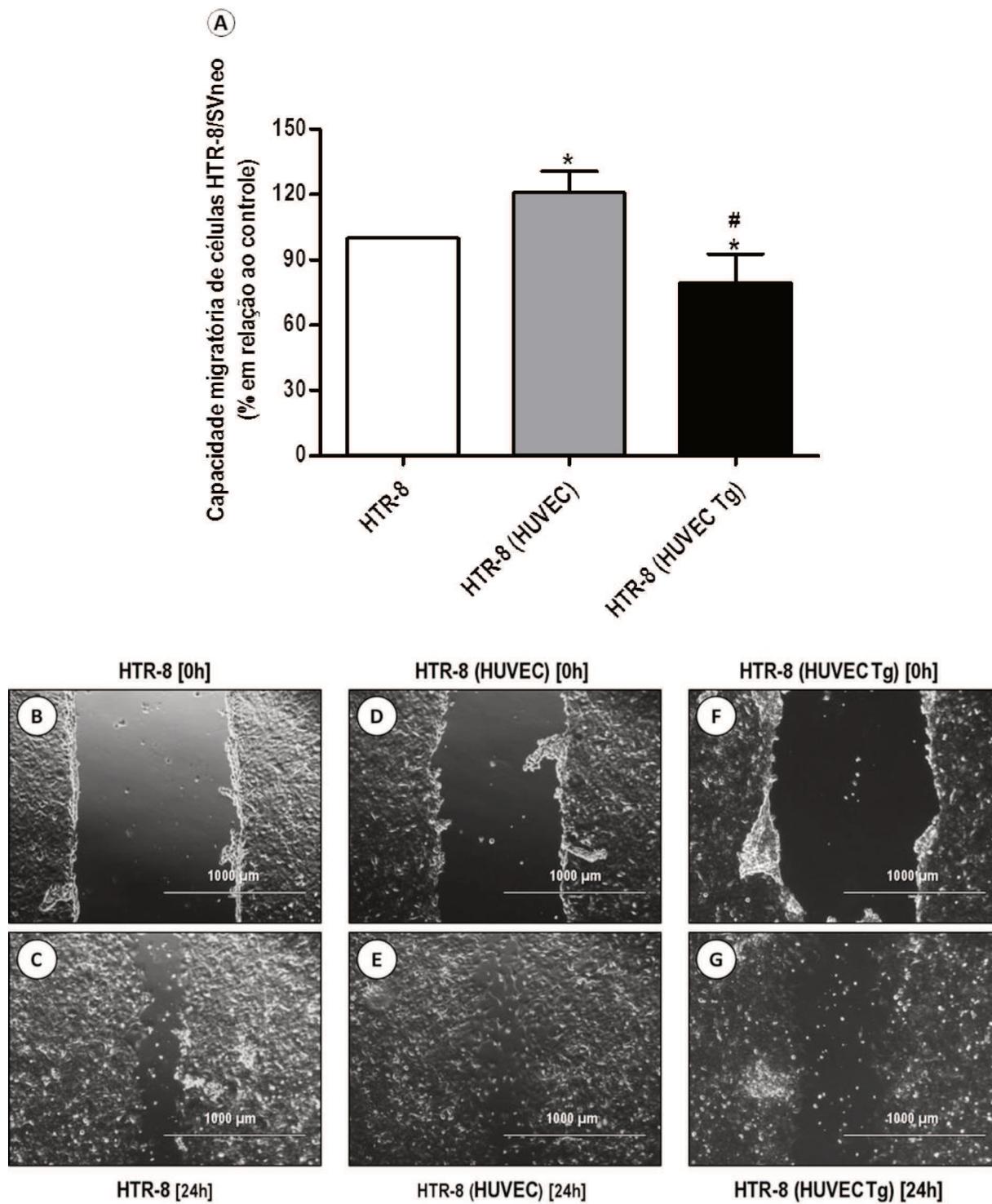


FIGURA 5. Avaliação do índice de morte das células HTR-8/SVneo após a co-cultura com células HUVEC, infectadas ou não por *T. gondii* (A). Gráficos em *dot plots* representativos do processo de morte celular por apoptose diante da marcação da exposição de fosfatidilserina combinado à marcação do núcleo por Iodeto de Propídeo (quadrante Q2). Condições: Controle (B), Controle [ISO-1] (C), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC (D), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC [ISO-1] (E), Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas (F) e Co-cultura entre as células HTR-8/SVneo e as células HUVEC infectadas [ISO-1] (G). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas *Dunn*. (*) Comparação entre as células não infectadas e não estimuladas (HTR-8/SVneo ou HTR-8 [ISO-1]) com as outras condições dentro do mesmo grupo. (#) Comparação entre as condições infectadas (HTR-8 (HUVEC Tg) ou HTR-8 (HUVEC Tg) [ISO-1]) com as condições não infectadas (HTR-8 (HUVEC) ou HTR-8 (HUVEC) [ISO-1]) do mesmo grupo. (\$) Comparação entre as mesmas condições em grupos diferentes ($P < 0.05$).

FIGURA 5

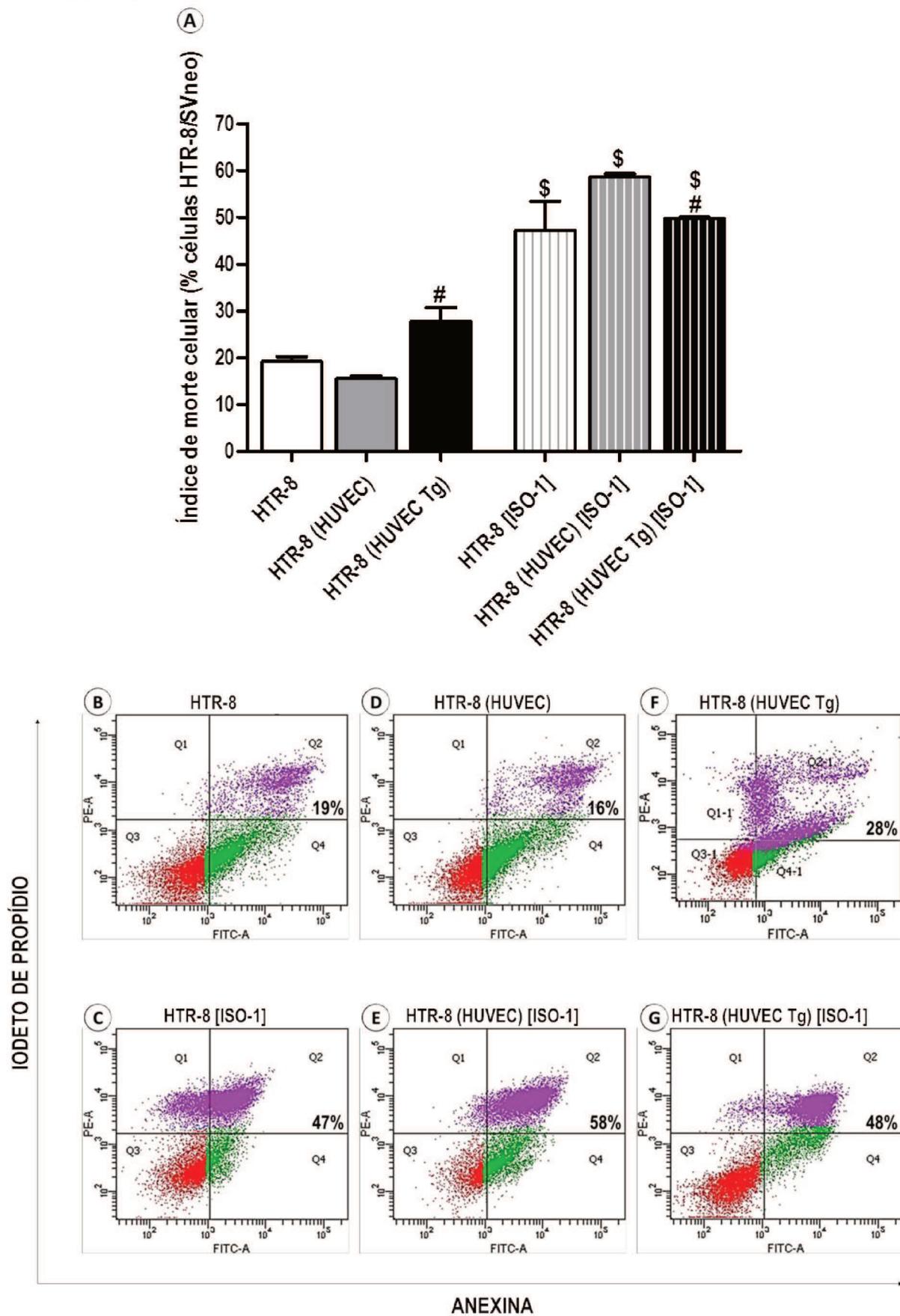
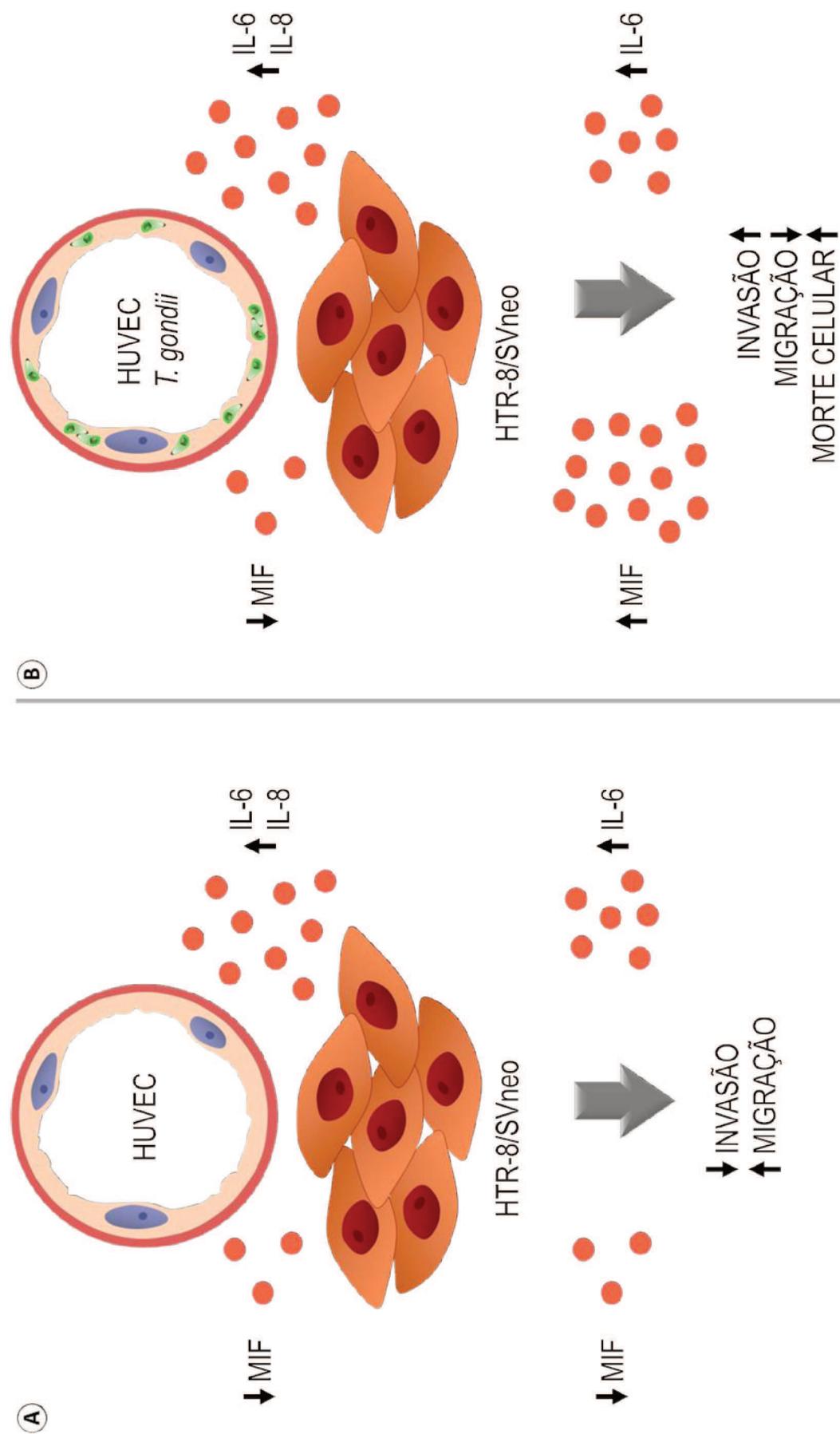


FIGURA 6. Modelo hipotético da interação entre as células trofoblásticas extravilosas e as células endoteliais alterando a produção de citocinas e influenciando algumas funções biológicas de células trofoblásticas como as habilidades invasiva e migratória e a morte celular. **(A)** Células HUVEC não infectadas durante a co-cultura com as células HTR-8/SVneo induziram a secreção das citocinas IL-6, IL-8 e a redução de MIF pelas células trofoblásticas. 24 h após co-cultura, menores índices de MIF e maiores níveis da citocina IL-6 foram secretados pelas células trofoblásticas quando comparadas com as células HTR-8/SVneo sem o estímulo das células HUVEC (controle). **(B)** Células HUVEC infectadas por *T. gondii* durante a co-cultura com as células HTR-8/SVneo induziram a secreção das citocinas IL-6, IL-8 e a redução de MIF pelas células trofoblásticas. 24 h após co-cultura, maiores índices de IL-6 e exacerbados níveis da citocina MIF foram secretados pelas células trofoblásticas em relação ao controle. A diferença da produção de MIF foi, provavelmente, o fator responsável pelo aumento da invasão, menor migração e aumento de morte celular pelas células HTR-8/SVneo, destacando-se dos eventos contrários relacionados às funções biológicas observadas em células trofoblásticas após serem co-cultivadas com HUVEC sem infecção, associando assim a interferência da infecção na comunicação celular.

FIGURA 6



9. ANEXO



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

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

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

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

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

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

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

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

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 566, 2007.

AHN, H.; PARK, J.; GILMAN-SACHS, A.; KWAK-KIM, J. Immunologic characteristics of preeclampsia, a comprehensive review. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 65, n. 4, p. 377-394, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00913.x>

AL-ABED, Y.; DABIDEEN, D.; ALJABARI, B.; VALSTER, A.; MESSMER, D.; OCHANI, M. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsi. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 36541-36544, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500243200>

AL-ABED, Y.; VANPATTEN, S. MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic. **Future MedChem.**, v. 3, p. 45–63, 2011. <https://doi.org/10.4155/fmc.10.281>

ANDER, S.E.; RUDZKI, E.N.; ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C.B.; BOYLE, J.P. Human placental syncytiotrophoblasts restrict *Toxoplasma gondii* attachment and replication and respond to infection by producing immunomodulatory chemokines. **MBio.** v. 9, n. 1, p. e01678-17, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.01678-17>

ANGELONI, M.B.; GUIRELLI, P.M.; FRANCO, P.S.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; SILVA, N.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, T.W.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta.** v. 34, n. 11, p. 973-982, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.09.005>

ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; CASTRO, A.S.; GOMES, A.O.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are

differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**. v. 30, n. 9, p. 785-791, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.07.002>

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

ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; DERMODY, T.S.; COYNE, C.B. Microbial vertical transmission during human pregnancy. **Cell Host Microbe**. v. 21, n. 5, p. 561-567, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>

BABA, M.; BATANOVA, T.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Adhesion of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected vehicle leukocytes to capillary endothelial cells triggers timely parasite egression. **Sci. Rep**. v. 7, n. 1, p. 5675, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05956-z>

BANERJEE, P.; MALIK, A.; MALHOTRA, S.S.; GUPTA, S.K. Role of STAT signaling and autocrine action of chemokines during H₂O₂ induced HTR-8/SVneo trophoblastic cells invasion. **J. Cell Physiol**. v. 234, n. 2, p. 1380-1397, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.26934>

BARBOSA, B.F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A.O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**. v. 35, n. 3, p. 152-162, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin. Exp. Immunol**. v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x>

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin

MIC2. **Cell Microbiol.** v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x>

BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.; FERRO, E.A.; IETTA, F.; FARIA, M.R.; LORENZON, A.R.; COSTA, A.F.; MARTUCCI, M. Review: putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. **Placenta.** v. 35, p. 51-56, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.015>

BORGES, M.; MAGALHÃES SILVA, T.; BRITO, C.; TEIXEIRA, N.; ROBERTS, C.W. How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? **Parasite Immunol.** v. 24, p. e12606, 2018. <https://doi.org/10.1111/pim.12606>

BRASIL, T.R.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; MORROT, A.; VETÖ ARNHOLDT, A.C. Host-*Toxoplasma gondii* coadaptation leads to fine tuning of the immune response. **Front. Immunol.** v. 13, n. 8, p. 1080, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01080>

BURKE, S.D.; KARUMANCHI, S.A. Spiral artery remodeling in preeclampsia revisited. **Hypertension.** v. 62, n. 6, p. 1013-1014, 2013. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02049>

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. **Placenta.** v. 60, p. 134-139, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.06.007>

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 3, n. 10, p. 791-800, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1200>

CALDAS, L.A.; de SOUZA, W. A window to *Toxoplasma gondii* egress. **Pathogens.** v. 7, n. 3, p. E69, 2018. <https://doi.org/10.3390/pathogens7030069>

CAÑEDO-SOLARES, I.; CALZADA-RUIZ, M.; ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; ORTIZ-MUÑIZ, A.R.; CORREA, D. Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite

strains. **Parasitol. Res.** v. 112, n. 8, p. 3029-3033, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3476-2>

CARDAROPOLI, S.; PAULESU, L.; ROMAGNOLI, R.; IETTA, F.; MARZIONI, D.; CASTELLUCCI, M.; ROLFO, A.; VASARIO, E.; PICCOLI, E.; TODROS, T. Macrophage migration inhibitory factor in fetoplacental tissues from preeclamptic pregnancies with or without fetal growth restriction. **Clin. Dev. Immunol.** v. 2012, p. 639342, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/639342>

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 10, n. 1, p. 83-89, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>

CARRUTHERS, V.B. Proteolysis and toxoplasma invasion. **Int. J. Parasitol.** v. 36, n. 5, p. 595-600, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.02.008>

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

CAVALCANTI, M.G.; MESQUITA, J.S.; MADI, K.; FEIJÓ, D.F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; SOUZA, H.S.; BOZZA, M.T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PLoS One.** v. 6, n. 9, p. e25259, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025259>

CHOUDHURY, R.H.; DUNK, C.E.; LYE, S.J.; APLIN, J.D.; HARRIS, L.K.; JONES, R.L. Extravillous trophoblast and endothelial cell crosstalk mediates leukocyte infiltration to the early remodeling decidual spiral arteriole wall. **J. Immunol.** v. 198, n. 10, p. 4115-4128, 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601175>

COMBE, C.L.; CURIEL, T.J.; MORETTO, M.M.; KHAN, I.A. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. **Infect. Immun.** v. 73, n. 8, p. 4913-4921, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4913-4921.2005>

CORTEZ, E.; STUMBO, A.C.; de CARVALHO, T.M.; BARBOSA, H.S.; CARVALHO, L. NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. **J. Parasitol.** v. 91, n. 5, p. 1052-1057, 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-467R1.1>

CRAVEN, C.M.; ZHAO, L.; WARD, K. Lateral placental growth occurs by trophoblast cell invasion of decidual veins. **Placenta.** v. 21, n. 2-3, p. 160-169, 2000. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0449>

DAMSKY, C.H.; FITZGERALD, M.L.; FISHER, S.J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, *in vivo*. **J. Clin. Invest.** v. 89, n. 1, p. 210–222, 1992. <https://doi.org/10.1172/JCI115565>

DAMSKY, C.H.; LIBRACH, C.; LIM, K.H.; FITZGERALD, M.L.; MCMASTER, M.T.; JANATPOUR, M.; ZHOU, Y.; LOGAN, S.K.; FISHER, S.J. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. **Development.** v. 120, n. 12, p. 3657–3666, 1994.

de OLIVEIRA GOMES, A.; de OLIVEIRA SILVA, D.A.; SILVA, N.M.; de FREITAS BARBOSA, B.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B.; FERMINO, M.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; BECHI, N.; PAULESU, L.R.; dos SANTOS, M.C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am. J. Pathol.** v. 178, n. 6, p. 2792-2801, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>

de OLIVEIRA, L.G; LASH, G.E.; MURRAY-DUNNING, C.; BULMER, J.J.; INNES, B.A.; SEARLE, R.F.; SASS, N.; ROBSON, S.C. Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. **Placenta.** v. 31, n. 7, p. 595-601, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.04.012>

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.569>

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet. Parasitol.** v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>

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. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

FALLAHI, S.; ROSTAMI, A.; NOUROLLAHOPOUR SHIADEH, M.; BEHNIAFAR, H.; PAKTINAT, S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.** v. 47, n. 3, p. 133-140, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2017.12.003>

FANG, Y.N.; HUANG, Z.L.; LI, H.; TAN, W.B.; ZHANG, Q.G.; WANG, L.; WU, J.L. Highly expressed miR-182-5p can promote preeclampsia progression by degrading RND3 and inhibiting HTR-8/SVneo cell invasion. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.** v. 22, n. 20, p. 6583-6590, 2018. https://doi.org/10.26355/eurrev_201810_16132

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

FEST, S.; ALDO, P.B.; ABRAHAMS, V.M.; VISINTIN, I.; ALVERO, A.; CHEN, R.; CHAVEZ, S.L.; ROMERO, R.; MOR, G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 57, n. 1, p. 55-66, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x>

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

FISHER, S.J. Why is placentation abnormal in preeclampsia? **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 213, n. 4, p. 115-122, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.042>

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E.P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A.A.; SHENOY, A.S.; TERRAZAS, L.I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A.R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.** v. 22, n. 10, p. 3661-3671, 2008. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111666>

FRANCO, P.S.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta.** v. 32, n. 11, p. 838-844, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.012>

GAO, L.; QI, H.B.; KAMANA, K.C.; ZHANG, X.M.; ZHANG, H.; BAKER, P.N. Excessive autophagy induces the failure of trophoblast invasion and vasculature: possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia. **J. Hypertens.** v. 33, n. 1, p. 106-117, 2015. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000366>

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. 8, n. 9, p. 906, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00906>

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

GUDE, N.M.; ROBERTS, C.T.; KALIONIS, B.; KING, R.G. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb. Res.** v. 114, n. 5-6, p. 397-407, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>

GUPTA, S.K.; MALHOTRA, S.S.; MALIK, A.; VERMA, S.; CHAUDHARY, P. Cell signaling pathways involved during invasion and syncytialization of trophoblast cells. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 75, n. 3, p. 361-371, 2016. <https://doi.org/10.1111/aji.12436>

HALASZ, M.; SZEKERES-BARTHO, J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. **J. Reprod. Immunol.** v. 97, n. 1, p. 43-50, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011>

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T.I.; MANASTER, I.; GAZIT, R.; YUTKIN, V.; BENHARROCH, D.; PORGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nat. Med.** v. 12, n. 9, p. 1065-1074, 2006. <https://doi.org/10.1038/nm1452>

HE, N.; van IPEREN, L.; de JONG, D.; SZUHAI, K.; HELMERHORST, F.M.; van der WESTERLAKEN, L.A.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S.M. Human extravillous trophoblasts penetrate decidual veins and lymphatics before remodeling spiral arteries during early pregnancy. **PLoS One.** v. 12, n. 1, p. e0169849, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169849>

HILL, J.A. T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women. **Hum. Reprod.** v. 2, p. 114-120, 1995.
https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_2.114

HUANG, L.; LI, Y.; WANG, C.; LI, N.; HOU, Y.; CHANG, R.; SUN, M.; WANG, R.; ZHU, L.; QIAO, C. Overexpression of collapsin response mediator protein 1 inhibits human trophoblast cells

proliferation, migration, and invasion. **Reprod. Sci.** p. 22:1933719118799214, 2018. <https://doi.org/10.1177/1933719118799214>

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

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J.C. Apoptosis and its role in the trophoblast. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 195, n. 1, p. 29-39, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.07.039>

IETTA, F.; FERRO, E.A.V.; BEVILACQUA, E.; BENINCASA, L.; MAIOLI, E.; PAULESU, L. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the survival of first trimester human placenta under induced stress conditions. **Sci. Rep.** v. 8, n. 1, p. 12150, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29797-6>

IRVING, J.A.; LALA, P.K. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. **Exp. Cell Res.** v. 217, n. 2, p. 419-427, 1995. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1105>

JAFFE, E.A.; NACHMAN, R.L.; BECKER, C.G.; MINICK, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **J. Clin. Invest.** v. 52, n. 11, p. 2745-2756, 1973. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>

JAUNIAUX, E.; GULBIS, B.; SCHANDENE, L.; COLLETTE, J.; HUSTIN, J. Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. **Mol. Hum. Reprod.** v. 2, n. 4, p. 239-243, 1996. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.4.239>

JEFFERS, V.; TAMPAKI, Z.; KIM, K.; SULLIVAN, W.J. Jr. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol. Life Sci.** v. 75, n. 13, p. 2355-2373, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-x>

JONES, J.L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.** v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001. <https://doi.org/10.1097/00006254-200105000-00025>

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

JOVANOVIĆ, M.; STEFANOSKA, I.; RADOJČIĆ, L.; VIĆOVAC, L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. **Reproduction.** v. 139, n. 4, p. 789-798, 2010. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0341>

JOVANOVIĆ, M.; VIĆOVAC, L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. **Placenta.** v. 30, n. 4, p. 320-328, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.013>

KATO, K. How does *Toxoplasma gondii* invade host cells? **J. Vet. Med. Sci.** v. 80, n. 11, p. 1702-1706, 2018. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0344>

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biol. Reprod.** v. 69, n. 1, p. 1-7, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014977>

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana.** 11.ed. São Paulo: Atheneu, p.163-172, 2005.

KIM, J.H.; LEE, J.; BAE, S.J.; KIM, Y.; PARK, B.J.; CHOI, J.W.; KWON, J.; CHA, G.H.; YOO, H.J.; JO, E.K.; BAE, Y.S.; LEE, Y.H.; YUK, J.M. NADPH oxidase 4 is required for the generation of macrophage migration inhibitory factor and host defense against *Toxoplasma gondii* infection. **Sci. Rep.** v. 7, n. 1, p. 6361, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06610-4>

KLEEMANN, R.; HAUSSER, A.; GEIGER, G.; MISCHKE, R.; BURGER-KENTISCHER, A.; FLIEGER, O.; JOHANNES, F.J.; ROGER, T.; CALANDRA, T.; KAPURNIOTU, A.; GRELL, M.; FINKELMEIER, D.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. **Nature**. v. 408, n. 6809, p. 211-216, 2000. <https://doi.org/10.1038/35041591>

LASH, G.E.; OTUN, H.A.; INNES, B.A.; KIRKLEY, M.; de OLIVEIRA, L.; SEARLE, R.F.; ROBSON, S.C.; BULMER, J.N. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. **FASEB J.** v. 20, n. 14, p. 2512-2518, 2006. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6616com>

LIANG, C.; PARK, A.Y.; GUAN, J. *In vitro* scratch assay: a convenient inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**. v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>

LÜDER, C.G.; GROSS, U.; LOPES, M.F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends Parasitol.** v. 17, n.10, p. 480-486, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02016-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02016-5)

LUE, H.; KAPURNIOTU, A.; FINGERLE-ROWSON, G.; ROGER, T.; LENG, L.; THIELE, M.; CALANDRA, T.; BUCALA, R.; BERNHAGEN, J. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. **Cell Signal**. v. 18, n. 5, p. 688-703, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.06.013>

MONTEIRO, L.J.; CUBILLOS, S.; SANCHEZ, M.; ACUÑA-GALLARDO, S.; VENEGAS, P.; HERRERA, V.; LAM, E.W.; VARAS-GODOY, M.; ILLANES, S.E. Reduced FOXM1 expression limits trophoblast migration and angiogenesis and is associated with preeclampsia. **Reprod. Sci.** p. 1:1933719118778798, 2018. <https://doi.org/10.1177/1933719118778798>

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A.B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nat. Rev. Immunol.** v. 17, n. 8, p. 469-482, 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>

MOSER, G.; HUPPERTZ, B. Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking. **Placenta**. v. 56, p. 19-26, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.007>

MOSER, G.; WEISS, G.; SUNDL, M.; GAUSTER, M.; SIWETZ, M.; LANG-OLIP, I.; HUPPERTZ, B. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: evidence for the invasion of uterine veins. **Histochem. Cell Biol.** v. 147, n. 3, p. 353-366, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1509-5>

MOSER, G.; WINDSPERGER, K.; POLLHEIMER, J.; de SOUSA LOPES, S.C.; HUPPERTZ, B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. **Histochem. Cell Biol.** v. 150, n.4, p. 361-370, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1699-0>

MULTHAUP, A.; HUPPERTZ, B.; GÖHNER, C.; BÖHRINGER, M.; MAI, M.; MARKERT, U.; SCHLEUßNER, E.; GROTEN, T. N-cadherin knockdown leads to disruption of trophoblastic and endothelial cell interaction in a 3D cell culture model - New insights in trophoblast invasion failure. **Cell Adh. Migr.** v. 12, n. 3, p. 259-270, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1699-0>

NICOLETTI, F.; CRÉANGE, A.; ORLIKOURSKI, D.; BOLGERT, F.; MANGANO, K.; METZ, C.; DI MARIO, R.; AL-ABED, Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) seems crucially involved in Guillain-Barré syndrome and experimental allergic neuritis. **J. Neuro. Immunol.**, v. 168, p. 168-174, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.07.019>

ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; CAÑEDO-SOLARES, I.; RICO-TORRES, C.P.; SAHAGÚN-RUIZ, A.; MEDINA-ESCUZIA, M.E.; CORREA, D. Congenital toxoplasmosis: candidate

host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. **Genes Immun.** v. 11, n. 5, p. 363-373, 2010. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>

PIAO, L.X.; CHENG, J.H.; AOSAI, F.; ZHAO, X.D.; NOROSE, K.; JIN, X.J. Cellular immunopathogenesis in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Parasite Immunol.** v. 40, n. 9, p. e12570, 2018. <https://doi.org/10.1111/pim.12570>

PIJNENBORG, R. Trophoblast invasion. **Reprod. Med. Rev.** v. 3, p. 53-73, 1994. <https://doi.org/10.1017/S0962279900000776>

PRINS, J.R.; GOMEZ-LOPEZ, N.; ROBERTSON, S.A. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. **J. Reprod. Immunol.** v. 95, n. 1-2, p. 1-14, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.05.004>

RED-HORSE, K.; KAPIDZIC, M.; ZHOU, Y.; FENG, K.T.; SINGH, H.; FISHER, S.J. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. **Development.** v. 132, n. 18, p. 4097-4106, 2005. <https://doi.org/10.1242/dev.01971>

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. In: **Toxoplasmosis**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 205-346, 2001.

REY, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: (Ed.). **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.321-334, 2001.

REYES, J.L.; TERRAZAS, L.I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GOMEZ-GARCIA, L.; SNIDER, H.; SATOSKAR, A.R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** v. 74, n. 6, p. 3170-3179, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.01648-05>

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

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

ROBERTSON, S.A.; O'CONNELL, A.; RAMSEY, A. The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.** v. 31, p. 97, 2000.

RODRIGUEZ-SOSA, M.; ROSAS, L.E.; DAVID, J.R.; BOJALIL, R.; SATOSKAR, A.R.; TERRAZAS, L.I. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. **Infect. Immun.** v. 71, n. 3, p. 1247-1254, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1247-1254.2003>

ROSADO, J. de D.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. **Int. J. Biol. Sci.** v. 7, n.9, p. 1239-1256, 2011. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1239>

SAITO, S.; KASAHARA, T.; SAKAKURA, S.; ENOMOTO, M.; UMEKAGE, H.; HARADA, N.; MORII, T.; NISHIKAWA, K.; NARITA, N.; ICHIJO, M. Interleukin-8 production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 200, n. 1, p. 378-383, 1994. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1459>

SAITO, S.; SAKAI, M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.** v. 59, n. 2, p. 161-173, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(03)00045-7)

SAKSIDA, T.; STOSIC-GRUJICIC, S.; TIMOTIJEVIC, G.; SANDLER, S.; STOJANOVIC, I. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from palmitic acid-induced apoptosis. **Immunol. Cell Biol.** v. 90, n. 7, p. 688-698, 2012. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.89>

SALAMONE, G.; FRACCAROLI, L.; GORI, S.; GRASSO, E.; PAPANINI, D.; GEFFNER, J.; PÉREZ LEIRÓS, C.; RAMHORST, R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Hum. Reprod.** v. 27, n. 9, p. 2598-2606, 2012. <https://doi.org/10.1093/humrep/des208>

SALAMONSEN, L.A.; HANNAN, N.J.; DIMITRIADIS, E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. **Semin. Reprod. Med.** v. 25, n. 6, p. 437-444, 2007. <https://doi.org/10.1055/s-2007-991041>

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M.; Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **Int. Immunol.** v. 30, n.3, p. 113-119, 2018. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>

SATOSKAR, A.R.; BOZZA, M.; RODRIGUEZ SOSA, M.; LIN, G.; DAVID, J.R. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. **Infect Immun.** v. 69, n. 2, p. 906–911, 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.906-911.2001>

SEKI, H.; MATUOKA, K.; INOOKU, H.; TAKEDA, S. TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. **J. Obstet. Gynaecol. Res.** v. 33, n. 4, p. 408-416, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2007.00551.x>

SHAH, Y.M.; ITO, S.; MORIMURA, K.; CHEN, C.; YIM, S.H.; HAASC, V.M.; GONZALES, F.J. Hypoxia-inducible factor augments experimental colites through and MIF-dependent inflammatory signaling cascade. **Gastroenterology**, v. 134, p. 2036-2048, 2008. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.009>

SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual control of trophoblast invasion. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 75, n. 3, p. 341-350, 2016. <https://doi.org/10.1111/aji.12466>

SINGH, P.P.; LUCCHI, N.W.; BLACKSTOCK, A.; UDHAYAKUMAR, V.; SINGH, N. Intervillous macrophage migration inhibitory factor is associated with adverse birth outcomes in a study population in Central India. **PLoS One**. v. 7, n. 12, p. e51678, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051678>

SONG, X.; LI, C.; LI, J.; LIU, L.; MENG, L.; DING, H.; LONG, W. The long noncoding RNA uc.294 is upregulated in early-onset pre-eclampsia and inhibits proliferation, invasion of trophoblast cells (HTR-8/SVneo). **J. Cell Physiol**. 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.27916>

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

STAVITSKY, A.B.; METZ, C.; LIU, S.; XIANLI, J.; BUCALA, R. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum*-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. **Parasite Immunol**. v. 25, n. 7, p. 369–374, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00641.x>

STOJANOVIC, I.; SAKSIDA, T.; NIKOLIC, I.; NICOLETTI, F.; STOSIC-GRUJICIC, S. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis *in vitro*. **Clin. Exp. Immunol**. v. 169, n. 2, p. 156-163, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04607.x>

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S.L.; ABRAHAMS, V.M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocr. Rev**. v. 26, n. 7, p. 877-97, 2005. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0003>

SYKES, L.; MACINTYRE, D.A.; YAP, X.J.; TEOH, T.G.; BENNETT, P.R. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators Inflamm**. v. 2012, p. 967629, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/967629>

TANTBIROJN, P.; CRUM, C.P.; PARAST, M.M. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. **Placenta**. v. 29, n. 7, p. 639-645, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.04.008>

TODROS, T.; BONTEMPO, S.; PICCOLI, E.; IETTA, F.; ROMAGNOLI, R.; BIOLCATI, M.; CASTELLUCCI, M.; PAULESU, L. Increased levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in preeclampsia. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 123, n. 2, p. 162-166, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2005.03.014>

TORGERSON, P.R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bull World Health Organ.** v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>

TSUI, K.H.; LI, H.Y.; CHENG, J.T.; SUNG, Y.J.; YEN, M.S.; HSIEH, S.L.; WANG, P.H. The role of nitric oxide in the outgrowth of trophoblast cells on human umbilical vein endothelial cells. **Taiwan J. Obstet. Gynecol.** v. 54, n. 3, p. 227-231, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2013.11.010>

VARGAS-VILLAVICENCIO, J.A.; de LEON-NAVA, M.A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation.** v. 16, n. 2, p. 114-121, 2009. <https://doi.org/10.1159/000180266>

VELICKY, P.; KNÖFLER, M.; POLLHEIMER, J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: intrinsic vs. maternal control. **Cell Adh. Migr.** v. 10, n. 1-2, p. 154-162, 2016. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1089376>

VENUGOPAL, K.; MARION, S. Secretory organelle trafficking in *Toxoplasma gondii*: A long story for a short travel. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 308, n. 7, p. 751-760, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.07.007>

WHITLEY, G.S.; DASH, P.R.; AYLING, L.J.; PREFUMO, F.; THILAGANATHAN, B.; CARTWRIGHT, J.E. Increased apoptosis in first trimester extravillous trophoblasts from pregnancies at higher risk of developing preeclampsia. **Am. J. Pathol.** v. 170, n. 6, p. 1903-1909, 2007. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070006>

WINDSPERGER, K.; DEKAN, S.; PILS, S.; GOLLETZ, C.; KUNIHS, V.; FIALA, C.; KRISTIANSEN, G.; KNÖFLER, M.; POLLHEIMER, J. Extravillous trophoblast invasion of venous as well as lymphatic vessels is altered in idiopathic, recurrent, spontaneous abortions. **Hum. Reprod.** v. 32, n. 6, p. 1208-1217, 2017. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex058>

WU, Z.M.; YANG, H.; LI, M.; YEH, C.C.; SCHATZ, F.; LOCKWOOD, C.J.; DI, W.; HUANG, S.J. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. **Placenta**, v. 33, n. 3, p. 188-194, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.007>

XUE, F.; YANG, J.; LI, Q.; ZHOU, H. Downregulation of microRNA-34a-5p promotes trophoblast cell migration and invasion via targeting Smad4. **Biosci. Rep.** p. BSR20181631, 2019. <https://doi.org/10.1042/BSR20181631>

YANG, M.; CHEN, Y.; CHEN, L.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.03.007>

YEH, C.C.; CHAO, K.C.; HUANG, S.J. Innate immunity, decidual cells, and preeclampsia. **Reprod. Sci.** v. 20, n. 4, p. 339-353, 2013. <https://doi.org/10.1177/1933719112450330>

YI, Y.; CHENG, J.C.; KLAUSEN, C.; LEUNG, P.C.K. TGF- β 1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2. **Placenta**. v. 68, p. 44-51, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.06.313>

ZHAO, M.; FENG, Y.; XIAO, J.; LIANG, J.; YIN, Y.; CHEN, D. Sodium tanshinone IIA sulfonate prevents hypoxic trophoblast-induced endothelial cell dysfunction via targeting HMGB1 release. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** v. 31, n. 7, 2017. <https://doi.org/10.1002/jbt.21903>