



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação funcional de *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) em células trofoblásticas humanas vilosa/extravilosa e em vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional infectados por *Toxoplasma gondii*

ALESSANDRA MONTEIRO ROSINI

Uberlândia

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação funcional de *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) em células trofoblásticas humanas vilosa/extravilosa e em vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional infectados por *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

ALESSANDRA MONTEIRO ROSINI

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

Uberlândia

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R821 2019	<p>Rosini, Alessandra Monteiro, 1994- Avaliação funcional de Toll-Like Receptor 4 (TLR4) em células trofoblásticas humanas vilosa/extravilosa e em vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional infectados por <i>Toxoplasma gondii</i>. [recurso eletrônico] / Alessandra Monteiro Rosini. - 2019.</p> <p>Orientadora: Prof Dra Bellisa de Freitas Barbosa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2051 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Imunologia. I. de Freitas Barbosa , Prof Dra Bellisa , 1983-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p>
--------------	---

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Alessandra Monteiro Rosini

“Avaliação Funcional de Toll-Like Receptor 4 em células trofoblásticas vilosas/extravilosas e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional infectados por *Toxoplasma gondii*”


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 5 de julho de 2019.


Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes – UFTM


Dra. Priscila Silva Franco – UFU/Monte Carmelo


Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa (orientadora) – ICBIM/UFU

DEDICATÓRIA:

A minha amada mãe Elizabeth Monteiro Rosini, dedico este trabalho. Saiba que a senhora foi essencial para o meu crescimento profissional, e foi peça fundamental da minha formação, sem você eu nada seria.

Dedico também ao meu amado pai Fred Jorge Rosini e minha querida irmã Andressa Monteiro Rosini, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu querido Frederico, por todo carinho.

Amo Vocês !

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me conceder o dom da vida, por me abençoar em cada momento, e por me guardar diante de seus braços.

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora Prof Dra Bellisa de Freitas Barbosa, por me receber de braços abertos, por confiar e acreditar em mim. Gostaria de deixar registrado o quanto a admiro, e o quanto você foi essencial para o início de minha formação profissional.

À querida Prof Dra Eloisa Amália Vieira Ferro, por ter me acolhido em seu laboratório, pelo carinho e confiança.

À Iliana e Rafaela agradeço pelo imenso apoio na execução do meu trabalho, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e pela compreensão. Aos queridos Guilherme, Marina e Luana, agradeço imensamente o carinho e ajuda constante.

Aos amigos de trabalho, Priscila, Thádía, Maria Tereza, Mayara, Pâmela, agradeço a companhia, as conversas jogadas fora, os ensinamentos e o apoio.

Ao amigo de longa data Alessandro e aos que fiz no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: Laura, Karine, Hellen e Vinícius, meus singelos agradecimentos, vocês são parte essencial da minha jornada.

Aos amigos da graduação, Ciro, Júlia, Larissa, Maísa, Matheus, por todo carinho ao longo dos anos.

Aos amigos de minha cidade natal, meus sinceros agradecimentos.

A minha família; razão de ser quem sou, muito obrigada.

As agências de fomento, pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIACÕES

CPRG- *Chlorophenol Red- β -D-galactopyranoside*

DNAs- *Ácido Desoxirribonucleico*

ELISA- *Ensaio de Imunoabsorção Enzimático*

FBS- *Soro Fetal Bovino*

hCG- *Gonadotrofina Coriônica Humana*

HC-UFU- *Hospital das Clínicas Da Universidade Federal de Uberlândia*

HLA-G- *Antígeno Leucocitário Humano G*

HPL- *Hormônio Lactogênio Placentário*

IFN- γ - *Interferon γ*

IgG- *Imunoglobulina G*

IgM- *Imunoglobulina M*

IL-1- *Interleucina-1*

IL-10- *Interleucina-10*

IL-12- *Interleucina-12*

IL-18- *Interleucina-18*

IL1- β - *Interleucina-1 beta*

IL-6- *Interleucina-6*

IL-8- *Interleucina-8*

IRF3- *Fator Regulador do Interferon do tipo 3*

LPS- *Lipopolissacarídeo*

MAPK- *Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno*

MgCl₂- *Cloreto de Magnésio*

MICs- *Micronemas*

MIF- *Fator Inibitório de Migração dos Macrófagos*

MYDD88- *Fator 88 de Diferenciação Mielóide*

NF- κ b- *Fator Nuclear kappa b*

NK- *Natural Killer*

PAMPs- *Padrões Moleculares Associados a Patógenos*

PBS- *Tampão Fosfato Salino*

PCR- *Reação em Cadeia Polimerase*

PETN-MG- *Programa Estadual de Triagem Neonatal*

PLAP- *Fosfatase Alcalina Placentária*

PRR- *Receptores de Reconhecimento Padrão*

RNAs- *Ácido Ribonucleico*

ROMs- *Proteases Romboides*

ROPs- *Roptrias*

SV40- *Vírus vacuolante símio 40*

TGF- β 1- *Fator de transformação do crescimento beta 1*

TH1- *T helper 1*

TH2- *T helper 2*

TLR- *Toll-like receptor*

TLR1- *Toll-like Receptor 1*

TLR2- *Toll-like Receptor 2*

TLR3- *Toll-like Receptor 3*

TLR4- *Toll-like Receptor 4*

TLR5- *Toll-like Receptor 5*

TLR6- Toll-like Receptor 6

TLR7- Toll-like Receptor 7

TLR8- Toll-like Receptor 8

TLR9-Toll-like Receptor 9

TLR10-Toll-like Receptor 10

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRIF- Proteína adaptadora contendo o domínio TIR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.2. Toxoplasmose.....	15
1.3. Resposta Imune a <i>T. gondii</i> : participação ativa de <i>Toll like receptors 4</i> (TLR4) ...	17
1.4. Resposta Imune na Gestação.....	19
2. OBJETIVO.....	24
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Cultura de células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo.....	25
3.2. Amostras de placenta humana e cultura de explantes vilosos coriônicos	25
3.3. Manutenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i> (clone 2F1).....	25
3.4. Ativação de TLR4 por LPS e infecção por <i>T. gondii</i> em células trofoblásticas humanas BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo	26
3.5. Ativação de TLR4 por LPS e infecção por <i>T. gondii</i> em explantes de vilos coriônicos humanos	26
3.6. Tratamento com inibidores de MyD88 ou TRIF em células trofoblásticas humanas BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo e infecção por <i>T. gondii</i>	27
3.7. Tratamento com inibidores de MyD88 ou TRIF em explantes de vilos coriônicos humanos e infecção por <i>T. gondii</i>	28
3.8. Reação de β -galactosidase	29
3.9. Dosagem de citocinas por ELISA	29
3.9.1. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1. A ativação de TLR4 por LPS reduziu a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo e em explantes de vilos coriônicos humanos	31
4.2. LPS induz menor produção de TGF- β 1, IL-10, TNF e maior secreção de IFN- γ em células BeWo infectadas por <i>T. gondii</i>	31
4.3. LPS induz maior produção de TGF- β 1, IL-10, TNF e IFN- γ em células JEG-3 infectadas por <i>T. gondii</i> , em um modo tempo dependente	32
4.4. LPS induz maior produção de IL-10, IFN- γ , MIF, e níveis reduzidos de TGF- β 1 e TNF em células HTR-8/SVneo infectadas com <i>T. gondii</i>	33
4.5. LPS induz maior produção de TGF- β 1, IL-10 e IFN- γ em vilos coriônicos humanos infectados por <i>T. gondii</i>	34
4.6. Os tratamentos com <i>Pepinh-MYD</i> e <i>Pepihn-TRIF</i> juntamente com LPS alteram o parasitismo em células BeWo e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional infectados com taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
5. DISCUSSÃO	38

6. CONCLUSÕES.....	46
7. FIGURAS	47
8. FIGURAS SUPLEMENTARES	63
REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

Toll-like receptors (TLRs) são receptores localizados na superfície celular ou nos compartimentos celulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da via TLR4 em células trofoblásticas, BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo e em explantes de vilosidades coriônicas humanas infectadas ou não com *Toxoplasma gondii*. Células BeWo infectadas e tratadas com LPS, independentemente do tempo de tratamento, mostraram uma diminuição no parasitismo total. No entanto, nas células JEG-3 e HTR8/SVneo, houve aumento da proliferação do parasita ou nenhuma mudança significativa no crescimento intracelular parasitário. Nos explantes de vilosidades coriônicas humanas houve redução do parasitismo total nas condições em que a via do TLR4 foi ativada por 48 horas pelo LPS. A partir da análise do perfil de citocinas, observou-se que, nas células BeWo infectadas e não tratadas, houve aumento da IL-10 e diminuição do IFN- γ . No entanto, quando tratados com LPS, houve aumento do IFN- γ e redução de TGF- β 1, IL-10 e TNF. Nas células JEG-3, houve um aumento na produção de TGF- β 1, TNF e IFN- γ , mas aumentou a IL-10 após 24 horas e uma diminuição após 48 horas de tratamento com LPS. Em HTR-8/SVneo, o tratamento com LPS promoveu aumento na produção de IFN- γ e diminuição na produção de TGF- β 1, MIF e TNF. Em vilosidades coriônicas humanas, o LPS induziu IFN- γ e TGF- β 1, mas reduziu a produção de TNF, IL-10, MIF e IL-8. Observou-se que a inibição do MyD88 reduziu ainda mais o parasitismo no BeWo, porém a inibição do TRIF aumentou o crescimento do *T. gondii* na BeWo, enquanto nenhum efeito significativo foi observado nas demais células. Finalmente, a inibição de MyD88 e TRIF aumentou a infecção por *T. gondii* nas vilosidades coriônicas. Pode-se concluir que a via TLR4 é importante para o controle da replicação de *T. gondii* nas vilosidades e células BeWo, pois a inibição de MyD88 e/ou TRIF reverteu a ativação de TLR4 por LPS, o que não foi observado em JEG-3 e HTR8/SVneo. Isso pode significar que vilosidades coriônicas e células transformadas se comportam diferentemente em sua resposta imune à infecção por *Toxoplasma*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Receptor Toll-like 4, Células Trofoblásticas, Gestação, Resposta Imune.

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are receptors that are located on the cell surface or in cell compartments. The objective of this work was to evaluate the influence of the Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway on trophoblastic cells, BeWo, JEG-3 and HTR-8/SVneo and on explants of chorionic human villi infected or not with *Toxoplasma gondii*. BeWo cells infected and treated with LPS, regardless of treatment time, showed a decrease in total parasitism. However, in JEG-3 and HTR8/SVneo cells, there was increased proliferation of the parasite or no significant change in parasitic intracellular growth. In explants of human chorionic villi there was a reduction of total parasitism under the conditions in which the TLR4 pathway was activated for 48 hours by LPS. Starting from cytokine profile analysis, it was observed that, in infected and untreated BeWo cells, there was an increase in IL-10 and a decrease in IFN- γ . However, when treated with LPS, there was an increase in the IFN- γ and reduction of TGF- β 1, IL-10 and TNF. In JEG-3 cells, there was an increase in the production of TGF- β 1, TNF and IFN- γ , but increased IL-10 after 24 hours and a decrease after 48 hours of LPS treatment. In HTR-8/SVneo, the LPS treatment promoted an increase in the production of IFN- γ , and a decrease in the production of TGF- β 1, MIF and TNF. In human chorionic villi, LPS induced IFN- γ and TGF- β 1, but reduced the production of TNF, IL-10, MIF and IL-8. It was observed that the inhibition of MyD88 further reduced parasitism in BeWo, however the inhibition of TRIF increased the growth of *T. gondii* in BeWo, while no significant effect was observed in the other cells. Finally, the inhibition of MyD88 and TRIF increased *T. gondii* infection in the chorionic villi. It can be concluded that the TLR4 pathway is important for the control of *T. gondii* replication in the villi and BeWo cells, since inhibition of MyD88 and/or TRIF reversed the activation of TLR4 by LPS, which was not observed in JEG-3 and HTR8/SVneo. This may mean that chorionic villi and transformed cells behave differently in their immune response to *Toxoplasma* infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toll-like Receptor 4, Trophoblast Cells, Gestation, Immune Response.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório (Apicomplexa, *Sarcocystidae*) de vertebrados e invertebrados, sendo o agente etiológico da toxoplasmose. Foi descoberto em 1908 no *Instituto Pasteur de Túnis* por Charles Nicolle e Louis Monceaux (SCHWARTZMAN et al., 1948). Após esse período até os dias atuais, o parasito vem sendo amplamente estudado (BLADER et al., 2015; OLAFSSON et al., 2018).

Devido as variações regionais, a toxoplasmose pode chegar a atingir de 10 a 90% da população dependendo de cada região (MAREZE et al., 2019). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com esse parasito (PAUL et al., 2018). Na América do Norte, no Sudeste Asiático, no norte da Europa e em algumas partes da África foi observada uma baixa soro prevalência, em torno de 10 a 30% da população, em contrapartida foram encontradas moderada ou alta prevalências (30 a 80%) nos países da Europa Central e do Sul, na América Latina e em alguns países africanos, respectivamente (GANGNEUX et al., 2012). Estudos recentes indicaram que a sorologia positiva para *T. gondii* é aproximadamente quatro vezes maior no Brasil quando comparada aos Estados Unidos (DUBEY et al., 2012a; FOROUTAN-RAD et al., 2016; PAUL et al., 2018).

A taxa de prevalência em gestantes pode chegar a 41,8% na Índia, 41% no Irã e 49% na Malásia (PAUL et al., 2018). No Brasil varia em torno de 36 a 92%, sendo considerado uma das maiores em relação à média global (FOROUTAN-RAD et al., 2016). Todos estes dados epidemiológicos tornam a toxoplasmose, especialmente a forma congênita da infecção, um grande problema de saúde pública.

T. gondii possui um conjunto de cepas que se diferenciam pelo genótipo, virulência e patogenicidade que provocam nos seus hospedeiros. Estas cepas foram classicamente divididas em tipos I, II e III, as chamadas de cepas clonais de *T. gondii*, (SHWAB et al., 2016).

As três linhagens clonais possuem baixo nível de divergência genética (1%~2% ao nível da sequência do DNA), entretanto possuem fenótipos de virulência diferentes, nos quais as cepas designadas como tipo I são classificadas como altamente virulentas,

causando mortalidade rápida em modelos murinos. Em contraste, as cepas II e III foram categorizadas de virulências moderada ou baixa, respectivamente, uma vez que causam uma infecção não letal e com menos disseminação de taquizoítos nos modelos experimentais murinos, sendo altamente responsivas ao sistema imunológico do hospedeiro, atingindo frequentemente a fase crônica da infecção (KHAN et al., 2005; WUJICKA et al., 2014; REGO et al., 2017). Geralmente, as cepas dos tipos I e II são tipicamente observadas em casos de toxoplasmose congênita grave e ocular, enquanto que cepas do tipo III são frequentemente isoladas de infecção ocular (ARMAND et al., 2017).

Além das cepas clonais I, II e III, análises feitas em amostras coletadas mundialmente identificaram 189 distintos genótipos de *T. gondii* e a grande diversidade genética foi encontrada na América do Sul e América Central. Estes novos genótipos foram denominados de cepas atípicas ou recombinantes. Adicionalmente, na América do Sul, as cepas apresentam-se bem mais virulentas em camundongos e em humanos do que as cepas clonais (SHWAB et al., 2014; SHWAB et al., 2016). Dubey e colaboradores (2012a) demonstraram que existem diversos isolados brasileiros de *T. gondii* que não se enquadram dentro das cepas clonais, portanto o Brasil é um país onde há uma grande quantidade de cepas atípicas, o que aumenta consideravelmente os problemas de saúde pública relacionados a toxoplasmose, desde que estas cepas têm capacidade de causar sintomatologia mais grave quando comparado as cepas clonais. Alguns estudos recentes mostram que no Brasil cepas do mesmo genótipo podem infectar humanos, animais domésticos, animais abatidos para o consumo humano e até aves silvestres, sugerindo uma via de infecção comum, assim incidindo uma facilidade de disseminação de cepas entre os diversos ambientes (REGO et al., 2018).

Existem três estágios de *T. gondii* que são infecciosos para todos hospedeiros: taquizoítos, bradizoítos e oocistos contendo esporozoítos (DUBEY et al., 1998). Os taquizoítos representam a forma rápida de multiplicação do parasito no organismo hospedeiro, são encontrados durante a fase aguda da infecção, tem aspecto de arco, banana ou meia-lua, se desenvolvem dentro do vacúolo parasitóforo de várias células hospedeiras e são pouco resistentes a ação do suco gástrico estomacal (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010). Já os bradizoítos, também conhecidos como cistozoítos, compreendem o estágio persistente da infecção na fase crônica, podem se desenvolver em diferentes órgãos como fígado, pulmão, rim, sendo mais prevalentes no

sistema nervoso central, região ocular, músculos esquelético e cardíaco, e se multiplicam de forma lenta e gradual por endodiogenia ou endopoligenia (DUBEY et al., 1998, NEVES, 2004; UMEDA et al., 2017). Os esporozoítos são encontrados apenas nos felídeos, tanto domésticos quanto selvagens, que representam os hospedeiros definitivos. Foram relatadas 17 espécies de felídeos capazes de eliminar nas suas fezes oocistos contendo esporozoítos (TENTER et al., 2000).

O ciclo de vida altera como definitivo (ciclo sexuado) e intermediário (ciclo assexuado) sendo denominado heteroxênico. A maneira de transmissão varia de acordo com as características físicas e com os hábitos higiênicos da população local. Os humanos adquirem *T. gondii* pela ingestão de carne crua ou malcozida de bovinos, caprinos, suínos ou aves contendo cistos teciduais, contato com fezes de felídeos contaminados por oocistos, através da ingestão de água ou alimentos contaminados também por oocistos, por transplantes de órgãos ou por transmissão vertical das formas taquizoítos (HILL; DUBEY 2002; GANGNEUX, 2012; CHEN et al., 2017).

Na fase assexuada, um hospedeiro intermediário, o homem por exemplo, ingere oocistos, cistos ou taquizoítos. Sendo um protozoário coccídeo intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii* possui diferentes organelas afim de manter com sucesso seu ciclo de vida nas células hospedeiras. Além de apresentar organelas típicas de células eucariontes, apresenta também diversas organelas citoplasmáticas que são características do filo que pertence, como exemplo o conóide, os dois anéis polares, micronemas e grânulos densos (BLADER; SAEIJ, 2009; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016).

A invasão da célula é um processo ativo. O parasito invade a célula hospedeira através da expressão e liberação de proteínas de micronemas (TgMICs) e de roptrias (ROPs e ROMs), organelas especializadas presentes na parte apical do parasito (SARDINHA-SILVA et al., 2017). As micronemas são responsáveis pela adesão do parasito à célula hospedeira (SOLDATI-FAVRE, 2008; SOUZA et al., 2010; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016), enquanto as roptrias e grânulos densos estão envolvidos na invasão propriamente dita e formação do vacúolo parasitóforo, que é derivado da membrana celular do hospedeiro (SOUZA et al., 2010). O apicoplasto é uma organela que está presente próximo ao núcleo, sendo essencial para o desenvolvimento intracelular do parasito exercendo funções de biossíntese de aminoácidos e de ácidos graxos, dentre outras funções ainda desconhecidas (NEVES, 2004).

Já dentro do organismo ocorre intensa multiplicação celular na forma de taquizoítos, que após a entrada ativa nas células hospedeiras do epitélio intestinal invadem ativamente novas células formando o vacúolo parasitóforo, multiplicando-se rapidamente. A célula então irá se romper, liberando os taquizoítos que invadirão novas células. Essa fase é caracterizada como proliferativa, consistindo da fase aguda da infecção. A evolução para a fase crônica consiste na formação de cistos em resposta ao sistema imunológico do hospedeiro (DUBEY et al., 1998, NEVES, 2004, GAGNEUX et al., 2012).

A fase sexuada ocorre apenas no intestino delgado de alguns felídeos (BETANCOURT et al., 2019). Quando os felinos ingerem oocistos infectantes ou cistos teciduais, esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos são liberados na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, e penetram nos enterócitos e por esquizogonia se transformam intracelularmente em esquizontes multinucleados após 3 a 7 dias de infecção. As subseqüentes esquizogonias ocorrem dentro das células epiteliais no intestino dos felídeos. O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos, que por sua vez, dão origem aos microgametas (masculinos) e macrogametas (feminino) após diversas gerações. Um zigoto diploide irá se desenvolver dentro dos oocistos após a fertilização do gameta feminino pelo gameta masculino. Oocistos não esporulados caem na luz intestinal e são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais em grande quantidade, que por sua vez esporulam no meio ambiente sob condições favoráveis (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; GANGNEUX, 2012; YAN et al., 2016; NAHOULI et al., 2017, BETANCOURT et al., 2019).

1.2. Toxoplasmose

A infecção por *T. gondii* caracteriza-se em duas formas, aguda e crônica. Na fase aguda é quando ocorre a proliferação de taquizoítos, na fase crônica os parasitos formam cistos teciduais contendo bradizoítos no seu interior, que podem permanecer nos tecidos dos hospedeiros intermediários e definitivos durante anos. Em humanos imunocompetentes, a doença pode se manifestar de forma sintomática e assintomática, portanto, muitos casos permanecem não diagnosticados e assintomáticos. Quando a infecção é sintomática, o sintoma mais característico é a linfadenopatia focal envolvendo a região do pescoço e da cabeça (RORMAN et al, 2006, CHANG et al., 2019). Em imunocomprometidos, como por exemplo pessoas que receberam transplante

de órgãos ou células tronco e que possuem a síndrome de imunodeficiência adquirida, predisõem a toxoplasmose grave (ZORGI et al., 2011; UMEDA et al., 2017).

A transmissão vertical ocorre quando a mulher adquire a infecção durante a gestação (WUJCICKA et al., 2014). São os taquizoítos que tem a capacidade de atravessar a barreira placentária e desencadear a toxoplasmose congênita, umas das formas mais preocupantes da toxoplasmose. Durante a gravidez, a infecção por *T. gondii* pode causar a morte prematura do feto. Após o nascimento, a criança pode manifestar alguns sintomas como hidrocefalia e coriorretinite, retardo mental, porém a infecção pode se passar despercebida na infância e chegar na adolescência, quando alguns distúrbios, como oculares por exemplo, podem se desenvolver (FOULON et al., 1999; PETERSEN et al., 2001; RAJAPAKSE et al., 2017; NAHOULI et al., 2017).

A toxoplasmose congênita é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A cada 10.000 nascimentos no Brasil, 5 a 23 crianças apresentam-se infectadas congenitamente por *T. gondii*, podendo ocorrer problemas neurológicos, cegueira, retardamento mental, lesões oculares e abortos (DUBEY et al., 2012b). Somente no estado de Minas Gerais, um recente estudo demonstrou 190 casos confirmados de toxoplasmose congênita num grupo de 146.307 recém-nascidos examinados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), o que equivale a 0,13% de positividade para *T. gondii* em crianças de Minas Gerais (CARELLOS et al., 2014). Dessa maneira, o estabelecimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que possam controlar a transmissão vertical de *T. gondii* é de extremo interesse para o nosso país e também para o mundo, uma vez que a redução da infecção congênita impacta diretamente na melhoria de condições de vida das crianças, diminuindo mortalidade e morbidade, bem como na diminuição das despesas públicas.

Tradicionalmente, a detecção de *T. gondii* foi baseado em avaliação microscópica de amostras fecais, hídricas, ambientais e teciduais, entretanto a identificação é menos sensível e não confiável (ZHANG et al., 2015). O isolamento de *T. gondii* através de bioensaio é considerado o padrão ouro para detecção da infecção, geralmente camundongos e gatos são utilizados, entretanto, camundongos nocaute para IFN- γ são preferencialmente escolhidos, porém sendo um método caro e demorado, não pode ser usado em larga escala, por esse motivo, geralmente é realizado pela detecção de IgG e IgM específicos para *T. gondii*. O teste de IgG é um teste confirmatório para diferenciar entre a fase aguda e crônica da infecção, porém técnicas moleculares como PCR

quantitativa em tempo real são importantes para o diagnóstico de alta sensibilidade (LIU et al., 2015; MOUSAVI et al., 2018).

Para alcançar todos esses objetivos de melhoria da saúde pública no que tange à toxoplasmose congênita, torna-se necessário entender os mecanismos que favorecem a transmissão transplacentária de *T. gondii*, ou seja, precisamos compreender o que ocorre na interface materno-fetal quando esta é acometida pela infecção, permitindo a passagem do parasito para os tecidos embrionários ou fetais.

1.3. Resposta Imune a *T. gondii*: participação ativa de *Toll like receptors 4* (TLR4)

Resposta imune é o termo utilizado para definir mecanismos imunológicos de diversas células, tecidos e órgãos, que juntos trabalham para permitir a homeostase do organismo. A resposta imune é mediada por mecanismos da imunidade inata no qual reage rapidamente de forma não específica a encontrar um patógeno, e adaptativa, sendo consistente e duradoura, mais específica e resulta em memória imunológica (GAZZINELLI et al., 1994).

O sistema imune inato responde a infecção através de receptores de reconhecimento padrão (PRR) onde reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que podem ser divididos em dois grupos: os ligantes de ácido nucléico (DNAs e RNAs) e os não ligantes (lipopolissacarídeos, lipopeptídeos e flagelina) (HOLMLUND et al., 2002; ABRAHAMS et al., 2004; BEHNKE et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Toll-like receptors (TLRs) são receptores de reconhecimento padrão que se localizam na superfície celular ou em compartimentos celulares como endossomos, retículo endoplasmático e lisossomas, e são evolutivamente adaptados para reconhecer os PAMPs, os principais iniciadores da imunidade inata e promotores da imunidade adaptativa através de mecanismos diretos e indiretos. Foram inicialmente descobertos em *Drosophila melanogaster* pelo seu papel no desenvolvimento embrionário, posteriormente foram reconhecidos como reguladores chave das respostas imunes. Até o momento, dez TLRs foram identificados em mamíferos (TLR1-TLR10) e doze em camundongos, sendo que cada TLR responde de maneira individual aos seus ligantes (LEULIER; LEMAITRE 2008; KOGA et al., 2009; NATAMA et al., 2018, NANOKA et al., 2018). Os TLRs transmembrana reconhecem principalmente os componentes da membrana microbiana como os lipídeos e lipoproteínas, a exemplo temos o TLR4 que

reconhece lipopolissacarídeo bacteriano, já TLR1 e TLR2 reconhece lipoproteínas, peptidoglicanos, ácidos lipoteicóicos dentre outros. Já os TLRs intracelulares, como o TLR3 e TLR7, reconhecem os ácidos nucleicos (RNA por exemplo) (KAWASAKI et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Com base nos importantes papéis desempenhados por *Toll-like receptors* (TLRs) no reconhecimento de microorganismos e na ativação de uma resposta imune inata, alguns são importantes para o reconhecimento de *T. gondii* como por exemplo TLR 2, 4, 9 e 11 (MELO et al., 2011; DUPONT et al., 2012; UMEDA et al., 2017).

Estudos demonstram que TLR4 desempenha importante papel na patogênese da toxoplasmose (WUJCICKA et al., 2014; ZARE-BIDAKI et al., 2014; WUJCICKA et al., 2015). O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente essencial da membrana de bactérias Gram-negativas, que induz uma resposta inflamatória e é reconhecido por TLR4, que após seu gatilho de ativação, uma cascata de eventos acontece. A ativação dos TLRs desencadeia vias dependentes do fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88) que resultam na ativação do fator de transcrição nuclear κ b (NF- κ b) (MELO et al., 2011; BOTOS et al., 2011; DUPONT et al., 2012). A ativação de NF- κ b leva a transcrição de genes e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1 β , IL-12 e IL-18, além de óxido nítrico sintase (iNOS) e alguns receptores semelhantes a NOD (NLRs). As vias de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) induzida por patógenos também modulam a produção de IL-12. Ambos os receptores para IL-1 β e IL-18 ativam também a sinalização de NF- κ b e MAPK com a produção subsequente de citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN)- γ de maneira a tentar controlar infecções (MELO et al., 2011).

Alguns estudos sugerem que TLR4 pode estar envolvido em mecanismos de proteção contra a infecção peritoneal contra *T. gondii* (FURUTA et al., 2006). É previsível a importância desse receptor em mulheres gestantes, onde observou-se que TLR4 é capaz de entrar nos endossomos e utilizar os adaptadores TRAM e TRIF para ativar o fator de transcrição IRF3 que contribui para a produção de IFN do tipo I, podendo portanto ser importante na resposta imune durante a gestação. Entretanto, também há relatos de que patógenos utilizam-se de TLR4 para evadir da resposta imune inata (WUJCICKA et al., 2014).

Uma resposta imune adaptativa é importante para a resistência a *T. gondii*. Durante a infecção humana, há uma maior susceptibilidade quando há defeitos primários ou adquiridos na função das células T (DUPONT et al., 2012). Acredita-se que a capacidade de células T CD8⁺ em controlar a infecção crônica pode estar associada a produção de citocinas como IFN- γ ou através da expressão de CD40. Além disso, um segundo sinal, com a ativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), promove o controle do parasito. Tanto TNF- α quanto CD40 utilizam a via de sinalização através de NF- κ b para controlar a parasitemia, configurando um perfil de resposta Th1 (DUPONT et al., 2012; SHER et al., 2017).

Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são altamente importantes na fase crônica, pois evitam a reativação da toxoplasmose (HOU et al., 2011; DUPONT et al., 2012). Portanto, na fase tardia da infecção, a produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ , os sinais moleculares como o TNF- α e a ligação de CD40 são necessários para a resistência nessa fase da doença (MELO et al., 2011; DUPONT et al., 2012).

Como previamente descrito acima, os receptores TLRs são bastante importantes durante uma resposta imune contra *T. gondii*. E, interessante, receptores do tipo *Toll* estão presentes durante toda a gestação na interface materno-fetal. TLR4 foi encontrado no citoplasma do sinciciotrofoblasto, também sendo expresso em células do citotrofoblasto do primeiro trimestre] (WUJICKA et al., 2014; GIERMAN et al., 2015).

1.4. Resposta Imune na Gestação

Uma gravidez bem-sucedida é o resultado de interações celulares, imunológicas e hormonais que se estabelecem em todo período gestacional. A gestação normal é caracterizada por inflamação leve e natural, enquanto os distúrbios que provocam inflamação placentária excessiva podem ter consequências nocivas para a mãe e para o feto (GROEN et al., 2015; AGHAEPOUR et al., 2017; CHÁVEZ et al., 2019). Os hormônios são essenciais para a mudança da resposta imune nos três primeiros trimestres da gravidez havendo um equilíbrio das respostas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. Durante esse período alguns aspectos da imunidade da mãe são modificados, com o aumento da circulação de monócitos, granulócitos e linfócitos T, e diminuição da expressão do complexo de histocompatibilidade classe II pelos monócitos circulantes da mãe (NAPSO et al., 2018).

Alterações hormonais como estradiol, estriol e progesterona levam a mudanças imunológicas durante a gestação, agindo de tal forma a evitar uma resposta imune inadequada contra os antígenos paternos que estão presentes no conceito que se desenvolve. Ao longo da gestação, o perfil Th1, que é um perfil pró-inflamatório, é modificado para um perfil mais anti-inflamatório Th2, no entanto, próximo ao parto o perfil de citocinas é modificado novamente para um perfil Th1, de forma a auxiliar e promover o trabalho de parto (ROBINSON; KLEIN 2012, NAPSO et al., 2018, EDEY et al., 2018).

A placenta é um órgão endócrino e transitório, altamente ativo durante toda a gestação. Um dos principais eventos iniciais para o estabelecimento da gravidez é o desenvolvimento de subpopulações de trofoblasto sendo crucial para a implantação e placentação. Os trofoblastos que formam a placenta tem origem do trofoectoderma embrionário, sendo a primeira linhagem celular de desenvolvimento em mamíferos (PIJNENBORG et al., 1981). Em mamíferos o trofoblasto é contraposto diretamente ao sangue materno, sendo considerada uma placenta hemocórica. Durante o processo de contato entre o trofoblasto e o sangue materno, o mesmo pode-se diferenciar em diferentes subpopulações, como a linhagem intersticial e endovascular, que exibem propriedades migratórias e invasivas, além de reconhecer, modificar e estimular outros tipos celulares da interfase materno-fetal (ROSARIO et al., 2009). O processo de comunicação celular é controlado por fatores maternos, que são liberados e/ou expressos pelas células trofoblásticas. A exemplo, temos as integrinas, E-caderinas, proteases, citocinas, isso permite que as células trofoblásticas degradem as proteínas da matriz extracelular, enquanto a decídua expressa várias proteínas inibitórias que em conjunto controlam a invasão das células trofoblásticas (SILVA et al., 2016). Em consequência, ocorre substituição das células endoteliais vasculares pelas células trofoblásticas, a medida que as artérias uterinas vão sendo remodeladas, formando vasos mais permissivos, que assim, facilitam o fluxo sanguíneo adequado para o feto (LUNGHI et al., 2007, SILVA et al., 2016). O trofoblasto é subdividido em diferentes populações de células, como o citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto, que formam conjuntamente o trofoblasto viloso, e há também o trofoblasto extraviloso (KURMAN et al., 2014, CIERNA et al., 2015, LEE et al., 2016).

O trofoblasto viloso está presente na superfície das vilosidades coriônicas, e estão envolvidos nas trocas de gases e nutrientes entre a mãe e o feto. Estão envolvidos

nas ancoragens de vilosidades coriônicas ao útero, penetrando profundamente a parede do útero (até o miométrio). Os citotrofblastos mononucleares isolados agregam-se e fundem-se para formar um sinciciotrofblasto multinucleado. (TARRADE et al., 2001).

O citotrofblasto é representado por células trofoblásticas individualizadas, é a camada interna do trofblasto viloso, que representam células epiteliais com inúmeras propriedades (GENBACEV et al., 2000). As mesmas são capazes de se fundirem para formar o sinciciotrofblasto, podem sofrer transformações nas quais os convertem em células não proliferativas e altamente invasivas, possuem a capacidade de se adaptar ao ambiente, fenocopiando suas células vizinhas, porém, uma das suas mais importantes atividades é a capacidade de auxiliar na implantação de um ovócito recém fertilizado ao útero. (BAINES; RENAUD 2017). Há duas subpopulações de citotrofblasto, denominadas intersticial e endovascular. O citotrofblasto intersticial tem como função primordial ancorar o concepto em crescimento ao tecido uterino materno, essas células podem invadir todo o endométrio e o terço proximal do miométrio, além disso produzem hormônios específicos da gravidez (VELICKY et al., 2016). O citotrofblasto endovascular, tem como principal função nas primeiras semanas de gestação penetrar nas artérias espirais maternas direcionando o fluxo sanguíneo através da placenta para o embrião, mais tarde eles modulam esses vasos de tal forma a aumentar seu calibre, de forma a entregar um maior fluxo de sangue para o feto (PIJNENBORG et al., 2006; CIERNA et al., 2015; VELICKY et al., 2016).

O sinciciotrofblasto é fundamental para o estabelecimento de uma gestação normal, portanto, qualquer fator que o prejudique impacta diretamente no desenvolvimento embrionário. É uma camada sincicial que se estende sobre as árvores vilosas (TANETTA et al., 2017). O sinciciotrofblasto é exposto abertamente ao sangue materno, tem capacidade de produzir a maioria dos hormônios da gestação como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), o lactôgenio placentário humano (hPL), fosfatase alcalina placentária (PLAP), estradiol, progesterona e regula a difusão de alguns gases (oxigênio, dióxido de carbono) e nutrientes, por estar em contato direto com o sangue materno, possui múltiplos núcleos e presença de reticulo endoplasmático granular (CIERNA et al., 2015). Além disso, tem a capacidade de liberar vesículas extracelulares, como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, e acredita-se que durante uma gestação normal, essas vesículas possuem um papel na indução das adaptações maternas (MINCHEVA et al., 2014; TANETTA et al., 2017).

Os trofoblasto extraviloso foi caracterizado mais recentemente, estando envolvidos no processo de implantação, sendo precisamente regulado, confinado ao endométrio e ao primeiro terço do miométrio, e às arteríolas espirais, capazes de expressar integrinas, moléculas de adesão celular e metaloproteases, além de expressar HLA-G, um hormônio que está intimamente relacionado na prevenção da rejeição materna (TARRADE et al., 2001, GONG et al., 2017).

Estudos comprovam que *T. gondii* coloniza preferencialmente trofoblasto extraviloso em comparação com sinciciotrofoblasto (WUJICKA et al., 2014). O motivo pelo qual isso acontece ainda não está bem estabelecido. É possível que diferenças na expressão de TLRs e/ou produção de citocinas e demais mediadores inflamatórios possam estar envolvidos nestes mecanismos (GIERMAN et al., 2015). Diversos estudos já exploram e investigam essa expressão diferencial de TLRs em diferentes subpopulações de trofoblasto. Na placenta humana de primeiro trimestre foi observada a expressão de TLR2 e TLR4 em citotrofoblasto e trofoblasto extraviloso, mas não em sinciciotrofoblasto (WUJICKA et al., 2014). Em adição, foi observada uma expressão limitada de TLRs em células trofoblásticas nos estágios iniciais da gestação, o que demonstra que estas células mostram-se menos capazes de lidar com infecções intra-uterinas do que aquelas capazes de expressar normalmente, como os macrófagos (WUJICKA et al., 2014). Em contrapartida, outros estudos apontam que a expressão de TLR2, TLR4 e TLR10 é fortemente presente em trofoblastos, além da produção de citocinas pró-inflamatórias. Acredita-se que a ativação dos TLRs pelo trofoblasto seja significativamente importante na gravidez (SCHATZ et al., 2012; TANGERAS et al., 2014). Citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto expressam TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 e TLR9, sendo que a transcrição dos genes de TLR6 não acontece no primeiro trimestre da gestação, sendo assim dependente do tempo para sua ativação. Se por intervenção de estímulos externos, em células trofoblásticas houver uma expressão limitada de TLRs, as células iniciais mostram-se menos capazes de lidar com infecções externas do que aquelas que já se diferenciaram. Sendo assim, os receptores do tipo *Toll* são extremamente importantes para garantir uma proteção materno fetal no período gestacional (WUJICKA et al., 2014).

A escolha de células trofoblásticas para o estudo de receptores do tipo *Toll* é fundamental, sendo uma ferramenta importante para o estudo da placenta e de infecção desencadeada por *T. gondii* na interface materno-fetal e qual o papel de receptores do

tipo *Toll* nesta interação. Uma variedade de linhagens celulares é utilizada atualmente como modelos *in vitro* de células trofoblásticas humanas, como BeWo e JEG-3, que se comportam como citotrofoblasto, e HTR-8 que é derivada de trofoblasto extraviloso, dentre outras. Estudos demonstram que a linhagem de células BeWo expressa nove dos dez RNAs de TLR, enquanto que JEG-3 expressa oito dos dez tipos de TLRs. Em adição, células HTR-8 expressam os receptores *Toll* do tipo TLR 1, TLR3, TLR4 e TLR5 (EQUILS et al., 2006; GIERMAN et al., 2015). Assim, visto que as células trofoblásticas expressam quase todos os dez tipos de TLRs, podemos considerar estas células como componentes da resposta imune inata na interface materno-fetal, portanto são células que estão potencialmente envolvidas na resposta imunológica contra patógenos como *T. gondii* durante a gestação. Sabe-se que a placenta humana expressa os dez TLRs conhecidos atualmente, e que alguns influem diretamente no trabalho de parto, como exemplo TLR2 e TLR5 (PUDNEY et al., 2016) e que além disso são amplamente expressos entre a 6-12^o semana de gestação. Além do mais, foi identificado em placentas pré-termo e a termo a proteína TLR2 e/ou TLR4 (PATNI et al., 2009), entretanto foi observado expressão preferencial de TLR4 nesse modelo *ex vivo* (BEIJAR et al., 2006; PATNI et al., 2009).

Considerando que a resposta imune contra *T. gondii* é preferencialmente pró-inflamatória e dependente de TLRs (MELO et al., 2011; DUPONT et al., 2012), que existe uma ampla expressão de TLRs na interface materno-fetal, especialmente nas células trofoblásticas (GIERMAN et al., 2015), e que a forma congênita da toxoplasmose é um grave problema de saúde pública no Brasil e em outras regiões do mundo (DUBEY et al., 2012), torna-se extremamente necessário investigar o papel de TLRs, principalmente TLR4, na infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas. Ainda não tem nada esclarecido na literatura científica se TLR4 executa uma função protetora contra *T. gondii* em células trofoblásticas, ou se o próprio parasito pode manipular a resposta desencadeada por TLR4 com o propósito de evadir dessa resposta imune. Os resultados obtidos com este projeto poderão propiciar conhecimentos essenciais na elaboração de futuras formas terapêuticas contra *T. gondii* na gestação, reduzindo significativamente as taxas de toxoplasmose congênita e impactando consideravelmente na qualidade de vida das crianças e recém-nascidos infectados congenitamente.

2. OBJETIVO

Avaliar e comparar a influência da via de *Toll-like receptor 4* em células trofoblásticas de três linhagens diferentes, BeWo e JEG-3 representantes de trofoblasto viloso, e HTR-8/SVneo representante de trofoblasto extraviloso, e em explantes de vilos humanos coriônicos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células e explantes ativados com LPS de *Escherichia coli*;
- Avaliar a produção de citocinas em células e explantes infectados ou não e tratados com LPS;
- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células e explantes tratados com inibidores da via de TLR4 (MyD88 e TRIF).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo

Células trofoblásticas humanas (BeWo, JEG-3 e HTR8/SVneo) foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em frascos de cultura em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 100 U / mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 µg / mL de estreptomicina (Sigma) e 10% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab) em uma incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (DA SILVA et al., 2017). O Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil, comunica que estudos realizados com linhagens celulares adquiridos comercialmente não necessitam de aprovação ética por este comitê (Protocolo nº 13/2012).

3.2. Amostras de placenta humana e cultura de explantes vilosos coriônicos

Placentas humanas de terceiro trimestre (n=5) foram adquiridas de pacientes grávidas após partos cesarianos eletivos (36-40 semanas de gestação) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), MG, Brasil. Os tecidos placentários foram coletados somente se as gestantes não apresentassem evidências de pré-eclâmpsia, hipertensão, doença cardíaca, diabetes, doenças infecciosas como toxoplasmose e outras manifestações que pudessem interferir nos resultados deste estudo. A coleta do tecido placentário foi autorizada de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil (Número de Aprovação: 2.360.812).

Após a coleta, o tecido placentário foi lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril para remover qualquer excesso de sangue, e a dissecação das vilosidades foi realizada usando um estereomicroscópio. Em seguida, vilosidades coriônicas flutuantes terminais foram coletadas, colocados em placas de 96 poços (uma por poço) e cultivadas em 200 µl de RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, penicilina e estreptomicina para 24 h a 37°C e 5% de CO₂. O volume dos explantes vilosos foi de aproximadamente ~ 10 mm³ (DA SILVA et al., 2017).

3.3. Manutenção de taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1)

Taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1), derivados da cepa RH altamente virulenta e expressando o gene da β-galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Vern Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan (EUA). O parasita foi

mantido em frascos de cultura contendo células BeWo em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de FBS a 37°C e 5% de CO₂ (DA SILVA et al., 2017).

3.4. Ativação de TLR4 por LPS e infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo

Células BeWo, JEG-3 ou HTR-8/SVneo foram adicionadas separadamente em placas de 96 poços (3x10⁴/200 µL/poço) em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂. Após 6h em cultura, as células foram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS) (InvivoGen, San Diego, CA, EUA), um ativador clássico da via de TLR4, a 1 µg/mL em meio a 10%. Após 24 h, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1), na proporção de 3 parasitos por célula (3:1), e novamente tratadas com 1 µg/mL de LPS em meio RPMI com 2% de FBS a 37°C e 5% de CO₂ por adicionais 24 h, totalizando 24 h de infecção por *T. gondii* e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Em paralelo, células BeWo, JEG-3 ou HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 96 poços (3x10⁴/200 µL/poço) por 24h, infectadas por *T. gondii* (3:1) e tratadas com 1 µg/mL de LPS em meio RPMI com 2% de FBS a 37°C e 5% de CO₂ por mais 24h, totalizando 24 h de infecção por *T. gondii* e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*). Como controle, as células foram infectadas e não tratadas com LPS (meio + *T. gondii*), ou não infectadas e tratadas com LPS (LPS 24h), ou não infectadas e não tratadas (meio).

Após 24 h de infecção e/ou tratamento com LPS por 24 ou 48h, os sobrenadantes livres de células foram coletados e congelados a -80°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA. Paralelamente, as células foram processadas para o ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* pela reação colorimétrica de β-galactosidase, conforme nossos estudos prévios (BARBOSA et al., 2015, DA SILVA et al., 2017). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi apresentada como número de taquizoítos obtido de acordo com uma curva padrão contendo taquizoítos livres (1 × 10⁶ a 15,6 × 10³). Três experimentos independentes em doze replicatas foram realizados.

3.5. Ativação de TLR4 por LPS e infecção por *T. gondii* em explantes de vilos coriônicos humanos

A proliferação intracelular de *T. gondii* foi também investigada em explantes vilosos tratados ou não com LPS.

Os vilos coriônicos humanos foram coletados e cultivados em placas de 96 poços (um por poço) em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂, conforme descrito anteriormente. Após 6h em cultura, os vilos foram tratados com LPS a 1 µg/mL em meio a 10%. Após 24 h, os vilos foram infectados com 1x10⁶ taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1) e novamente tratados com 1 µg/mL de LPS em meio RPMI com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂ por adicionais 24 h, totalizando 24 h de infecção por *T. gondii* e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Em paralelo, vilos foram cultivados em placas de 96 poços, infectados por *T. gondii* (1x10⁶) e tratados com 1 µg/mL de LPS em meio RPMI com 2% de FBS a 37 °C e 5% de CO₂ por mais 24h, totalizando 24 h de infecção por *T. gondii* e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*). Como controle, os vilos foram infectados e não tratados com LPS (meio + *T. gondii*), ou não infectados e tratados com LPS (LPS 24h), ou não infectados e não tratados (meio).

Após 24h de infecção e/ou tratamento com LPS por 24 ou 48h, os sobrenadantes livres foram coletados e congelados a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA. Para avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* nas amostras de explantes de vilos, estes foram lisados pela adição de 150 µL de tampão RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sódio (p/v) e 0.1% (p/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] suplementado com coquetel de inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha) e homogeneizados em nitrogênio líquido para extração de proteína total. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 rpm por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para mensurar a proteína total (µg/mL) usando o ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Aliquotas de 20 µL de cada amostra foram utilizadas para determinar a proliferação intracelular de *T. gondii* por ensaio de β-galactosidase, conforme descrito anteriormente. Em seguida, os dados do número de taquizoítos foram normalizados de acordo com a concentração proteica de cada vilo, mostrando o número de taquizoítos por µg de tecido (DA SILVA et al., 2017). Quatro amostras de placentas diferentes foram coletadas e quatro experimentos independentes foram realizados em dezesseis replicatas.

3.6. Tratamento com inibidores de MyD88 ou TRIF em células trofoblásticas humanas BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo e infecção por *T. gondii*

Após avaliar o efeito da ativação clássica de TLR4 por LPS na modulação da carga parasitária nas três linhagens celulares BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo, nós

buscamos verificar qual das vias dependentes de TLR4 estariam envolvidas nesta modulação da infecção por *T. gondii*, MyD88 e/ou TRIF.

Com este propósito, as células foram cultivadas em placas de 96 poços ($3 \times 10^4/200 \mu\text{L}/\text{poço}$) por 24 h em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram pré-incubadas com peptídeos inibidores da via de TLR4, peptídeo Pepinh-MYD (InvivoGen, San Diego, CA, EUA) ou peptídeo Pepinh-TRIF (InvivoGen) na concentração de 5 μM , na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) em meio RPMI com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂. Como controle da inibição de MyD88 ou TRIF, as células foram tratadas com 5 μM de peptídeos controles (InvivoGen) correspondentes a cada peptídeo inibidor, ou foram tratadas apenas com meio RPMI com 10% de FBS. Após 6 h de tratamentos, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) e mantidas por adicionais 24 h em cultura. Finalmente, as células foram coletadas e processadas para o ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* pela reação colorimétrica da β -galactosidase, conforme descrito anteriormente (Barbosa et al., 2014, DA SILVA et al., 2017). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi demonstrada como número de taquizoítos obtido de acordo com uma curva padrão de referência contendo taquizoítos livres (de 1×10^6 a $15,6 \times 10^3$). Foram realizados dois experimentos independentes em seis replicatas.

3.7. Tratamento com inibidores de MyD88 ou TRIF em explantes de vilos coriônicos humanos e infecção por *T. gondii*

Após avaliar o efeito da ativação clássica de TLR4 por LPS na modulação da carga parasitária em explantes de vilos coriônicos humanos, nós também buscamos verificar qual das vias dependentes de TLR4 estariam envolvidas nesta modulação da infecção por *T. gondii* nos vilos, MyD88 e/ou TRIF.

Com este propósito, os vilos foram cultivados em placas de 96 poços (um por poço) por 24 h em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, os vilos foram pré-incubados com peptídeos inibidores da via de TLR4, Pepinh-MYD ou peptídeo Pepinh-TRIF na concentração de 5 μM , na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) em meio RPMI com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂. Como controle da inibição de MyD88 ou TRIF, os vilos foram tratados com 5 μM de peptídeos controles correspondentes a cada peptídeo inibidor, ou foram tratados apenas com meio RPMI com 10% de FBS. Após 6 h de tratamentos, os vilos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* (1×10^6) e mantidos por adicionais 24 h em cultura.

Finalmente, os vilos foram coletados e processados para o ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* pela reação colorimétrica da β -galactosidase, conforme descrito anteriormente (DA SILVA et al., 2017). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi demonstrada como número de taquizoítos obtido de acordo com uma curva padrão de referência contendo taquizoítos livres (de 1×10^6 a $15,6 \times 10^3$). Os dados do número de taquizoítos foram normalizados de acordo com a concentração proteica de cada vilo, mostrando o número de taquizoítos por μg de tecido. Foi realizado um experimento em seis replicatas.

3.8. Reação de β -galactosidase

Amostras de taquizoítos de *T. gondii* (2F1) e células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo infectadas, provenientes das diversas condições experimentais acima descritas, foram lisadas com 100 μl de tampão de lise RIPA [50mM de Tris-HCL, 150 Mm de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% (peso/volume) de deoxicolato de sódio e 0,1% (peso/volume) de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5)] durante 30 minutos e incubados com 100 μl de tampão de ensaio (PBS a 100 mM pH 7,3; 9 mM de MgCl_2 e 102 mM de β -mercaptoetanol) e 40 μL de CPRG (chlorophenol red-D-galactopyranoside; Roche Diagnostic, Manhein, Alemanha) a 6,25 mM por adicionais 30 minutos. Após esse período, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570 nm usando leitor de microplacas (Titertek Multisak Plus, Flow Laboratories) e os dados foram apresentados como índice de proliferação intracelular de *T. gondii* (β -gal – número total de taquizoítos) de acordo com as referências de curva padrão.

Para os vilos coriônicos humanos, primeiramente foi adicionado tampão RIPA contendo inibidor de proteases (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Em seguida, os vilos foram macerados para extração de proteínas, sendo centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos para posterior coleta de sobrenadante. Posteriormente foi dosado o nível proteico das amostras pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de 20 μl de cada amostra foram utilizadas para o ensaio de β -galactosidase, conforme acima descrito, com o objetivo de normalizar o índice de proliferação de *T. gondii* (número total de taquizoítos) de acordo com a quantidade de proteína total das amostras de vilos.

3.9. Dosagem de citocinas por ELISA

As citocinas humanas IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF, MIF, IL-10 e TGF- β 1 foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura de células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo e

em explantes de vilos coriônicos provenientes das diversas condições experimentais descritas acima. As dosagens destas citocinas nos sobrenadantes foram realizadas usando o teste imunoenzimático ELISA, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Os dados foram expressos em pg/mL para células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo, enquanto que para explantes vilosos, os dados foram normalizados de acordo com a concentração protéica de cada vilo, conforme no item 3.8. Portanto, para explantes vilosos, os dados sobre citocinas foram obtidos pela razão entre a concentração de citocinas em pg/mL e a concentração de proteína total do ensaio de Bradford em $\mu\text{g/mL}$, resultando na dosagem de citocinas em pg/ μg de tecido. Os limites de detecção foram determinados a partir das curvas padrão de cada citocina. IL-6: 4,7 pg/mL; IL-8: 3,125 pg/mL, IL-10: 7,8 pg/mL, IFN- γ , 4,7 pg/mL TNF: 7,8 pg/mL; MIF: 7,8 pg/mL e TGF- β 1: 125 pg/mL.

3.9.1. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais utilizando o GraphPad Prisma Software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni, ou Kruskal-Wallis com o teste post-hoc de comparação múltipla de Dunns, quando apropriado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. A ativação de TLR4 por LPS reduziu a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e em explantes de vilos coriônicos humanos

Primeiramente, nós avaliamos se a ativação da via de TLR4 teria algum efeito significativo na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo. Com este propósito, as células foram tratadas com LPS por 24 ou 48 h, processadas para o ensaio de β -galactosidase e analisadas quanto ao número total de taquizoítos. Foi observado que o tratamento por 24 ou 48 h com LPS induziu significativa redução do número de taquizoítos em células BeWo quando comparado às células não tratadas (meio) ($P < 0.05$, Fig. 1A). Em células JEG-3, quando a via de TLR4 foi ativada por 24 h, não houve diferença estatística significativa na replicação do parasito, porém, quando essas células foram tratadas com LPS por 48 h, houve aumento significativo na proliferação intracelular de *T. gondii* em relação às células não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 1B). Por outro lado, células HTR-8/SVneo não demonstraram nenhuma alteração significativa no crescimento intracelular de *T. gondii*, independentemente do tempo de tratamento com LPS, quando comparado com células não tratadas (Fig. 1C).

Em segundo momento, nós investigamos se a ativação da via de TLR4 teria algum efeito significativo na proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos. Foi observada uma significativa redução do número de taquizoítos após 48 h de tratamento com LPS em vilos placentários se comparado aos vilos não tratados ($P < 0.05$, Fig. 2).

Portanto, estes dados demonstraram que células BeWo e vilos coriônicos, mas não células JEG-3 e HTR-8/SVneo, responderam a ativação de TLR4 reduzindo a proliferação intracelular de *T. gondii*.

4.2. LPS induz menor produção de TGF- β 1, IL-10, TNF e maior secreção de IFN- γ em células BeWo infectadas por *T. gondii*

Após observar a redução da proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo tratadas com LPS, foi realizado o teste ELISA no sobrenadante de cultura destas células para verificar o perfil de produção de citocinas após ativação de TLR4 (Fig. 3).

Células BeWo não tratadas com LPS e infectadas por *T. gondii* demonstraram maior produção de IL-10 e TNF, porém menor secreção de IFN, em comparação com

células não tratadas e não infectadas ($P < 0.05$, Fig. 3B-D). Entretanto, na ausência de infecção por *T. gondii*, células BeWo tratadas com LPS por 24 h aumentaram a produção de IL-10 e TNF ($P < 0.05$) e não alteraram significativamente os níveis de TGF- β 1 e IFN, quando comparado às células não infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 3A-D).

Com relação a células BeWo infectadas e tratadas com LPS, independentemente do tempo de tratamento, nós observamos uma significativa redução na secreção de TGF- β 1 e IL-10 em relação às células não infectadas e não tratadas, não infectadas e tratadas com LPS, ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 3A-B). Em adição, células BeWo infectadas e tratadas por 48 h com LPS reduziram significativamente a secreção de IL-10 quando comparado às células infectadas e tratadas com LPS por 24 h ($P < 0.05$, Fig. 3A). O tratamento com LPS por 24 h em células BeWo infectadas induziu diminuição na produção de TNF e IFN se comparado às células não infectadas e tratadas ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$), ou não infectadas e não tratadas ($P < 0.05$), respectivamente (Fig. 3C-D). Por outro lado, o tratamento por 48 h com LPS proporcionou redução de TNF e significativo aumento de IFN em comparação às células não tratadas e não infectadas, tratadas e não infectadas, não tratadas e infectadas, ou tratadas por 24 h e infectadas ($P < 0.05$, Fig. 3C-D).

Finalmente, os níveis de IL-6, MIF e IL-8 foram maiores em células BeWo infectadas, independentemente da presença de tratamento por LPS, quando comparado às células não tratadas e não infectadas ou tratadas e não infectadas (Figura Suplementar 1).

Portanto, LPS foi capaz de induzir menor produção de TGF- β 1, IL-10, TNF e maior secreção de IFN em células BeWo infectadas por *T. gondii*.

4.3. LPS induz maior produção de TGF- β 1, IL-10, TNF e IFN- γ em células JEG-3 infectadas por *T. gondii*, em um modo tempo dependente

Após verificar o aumento da proliferação intracelular de taquizoítos de *T. gondii* em células JEG-3 tratadas com LPS, foi realizado o teste ELISA no sobrenadante de cultura destas células para verificar o perfil de produção de citocinas após ativação de TLR4 (Fig. 4).

Células JEG-3 não infectadas e tratadas com LPS por 24 h, ou células infectadas por *T. gondii* e não tratadas com LPS, apresentaram menor produção de IL-10 e TNF,

porém maior secreção de IFN, em relação a células não infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 4B-D).

Nós observamos também que células JEG-3 infectadas e tratadas com LPS por 48 horas mostraram aumento na secreção de TGF- β 1 quando comparado com todas as demais condições experimentais ($P < 0.05$, Fig. 4A). Em relação a produção de IL-10, foi possível observar uma redução na sua produção em células JEG-3 infectadas e tratadas com LPS quando comparado às células não infectadas e não tratadas ($P < 0.05$), porém a infecção e o tratamento com LPS por 24 h promoveram maiores níveis de IL-10 em relação às células infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 4B). Em adição, o tratamento com LPS por 48 h em células infectadas induziu menor liberação de IL-10 se comparado com células não infectadas e tratadas ou infectadas e tratadas por 24 h ($P < 0.05$, Fig. 4B). Com relação a TNF, nós observamos que quando as células são infectadas e estimuladas com LPS por 48 h, houve maior produção dessa citocina quando comparado ao controle infectado, células não infectadas e tratadas, ou ainda células infectadas e tratadas por 24 h ($P < 0.05$, Fig. 4C). Observou-se também que ocorreu aumento da secreção de IFN- γ em células JEG-3 infectadas e tratadas por 24 h em comparação com células não infectadas e tratadas ($P < 0.05$), enquanto que células infectadas e tratadas por 48 h promoveram maior secreção de IFN quando comparada às células não infectadas e tratadas, infectadas e não tratadas ou infectadas e tratadas por 24 h ($P < 0.05$, Fig. 4D).

Finalmente, os níveis de IL-6 e MIF foram maiores em células JEG-3 infectadas, independentemente da presença de tratamento por LPS, e não houveram alterações significativas nos níveis de IL-8, quando comparado às células não tratadas e não infectadas ou tratadas e não infectadas (Figura Suplementar 2).

Portanto, maior produção de TGF- β 1, IL-10, TNF e IFN γ foi induzida após 24 e/ou 48 h de tratamento com LPS em células JEG-3 infectadas por *T. gondii*.

4.4. LPS induz maior produção de IL-10, IFN- γ , MIF, e níveis reduzidos de TGF- β 1 e TNF em células HTR-8/SVneo infectadas com *T. gondii*

Após verificar que não houveram alterações significativas na proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo tratadas em diferentes tempos com LPS, foi realizado o ELISA para averiguar os níveis de citocinas nos sobrenadantes coletados (Fig. 5).

Células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* e não tratadas com LPS demonstraram menor produção de IL-10 e maior secreção de IFN e MIF se comparado às células não infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 5B, D-E). No entanto, células não infectadas e tratadas com LPS por 24 h mostraram menores níveis de TGF- β 1 e IL-10, e maiores níveis de IFN- γ em comparação com o meio sem infecção ($P < 0.05$, Fig. 5A-B, D).

Com relação a produção de TGF- β 1 e IL-10 em células infectadas e tratadas com LPS por 24 h, nós observamos uma diminuição na produção dessas citocinas em relação ao meio não infectado ($P < 0.05$, Fig. 5A-B). Em adição, células infectadas e tratadas com LPS por 48 h aumentaram a liberação de IL-10 quando comparado às células não infectadas e tratadas ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 5B). Para as citocinas pró-inflamatórias, a infecção pelo parasito e o tratamento com LPS induziram menor produção de TNF e MIF se comparado às células não infectadas e não tratadas, não infectadas e tratadas, infectadas e não tratadas, ou às células somente infectadas e não tratadas, respectivamente ($P < 0.05$, Fig. 5C, E). Finalmente, células infectadas e tratadas com LPS mostraram maiores níveis de IFN quando comparado às células não infectadas e tratadas ou infectadas e não tratadas ($P < 0.05$, Fig. 5D). Os níveis de IL-6 e IL-8 foram maiores em células HTR-8/SVneo infectadas, independentemente da presença de tratamento por LPS, quando comparado às células não tratadas e não infectadas ou tratadas e não infectadas (Figura Suplementar 3).

Portanto, maior produção de IL-10, IFN e MIF, bem como níveis reduzidos de TGF- β 1 e TNF, foram induzidos após 24 e/ou 48 h de tratamento com LPS em células HTR-R/SVneo infectadas por *T. gondii*.

4.5. LPS induz maior produção de TGF- β 1, IL-10 e IFN- γ em vilos coriônicos humanos infectados por *T. gondii*

Após verificar a diminuição na proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional tratados com LPS, foi realizado o teste ELISA no sobrenadante dos vilos para verificar o perfil de secreção de citocinas (Fig. 6).

Explantes de vilos coriônicos infectados por *T. gondii* e não tratados com LPS mostraram aumento apenas de TNF quando comparado aos vilos não infectados e não tratados ($P < 0.05$, Fig. 6C). Entretanto, aumento de IL-10 e IFN foram observados em

vilos apenas infectados em comparação com vilos não infectados e tratados com LPS por 24 h ($P < 0.05$, Fig. 6B, D). Em adição, vilos não infectados e tratados por 24 h com LPS demonstraram significativa produção de IL-10 e TNF em comparação ao meio não infectado ($P < 0.05$, Fig. 6B-C). Vilos infectados e tratados com LPS por 48 h foram capazes de aumentar significativamente a secreção de TGF- β 1, IL-10 e IFN em comparação com ao vilo não infectado e não tratado, infectado e não tratado ou ainda não infectado e tratado com LPS, exceto para IL-10 ($P < 0.05$, Fig. 6A-B, D). Por outro lado, vilos infectados e tratados por 48 h reduziram de modo significativo a produção de TNF em relação aos vilos não infectados e tratados, infectados e não tratados, ou ainda infectados e tratados por 24 h ($P < 0.05$, Fig. 6C). Também, vilos infectados e tratados por 24 h aumentaram os níveis de TNF e IFN- γ quando comparado ao meio não infectado ou ao vilo não infectado e tratado, respectivamente ($P < 0.05$, Fig. 6C-D).

As citocinas IL-8 e MIF foram reduzidas em todas as condições experimentais em comparação a vilos não tratados e não infectados ($P < 0.05$), enquanto nenhuma alteração significativa foi observada para produção de IL-6 (Figura Suplementar 4).

Portanto, LPS foi capaz de induzir maior produção de TGF- β 1, IL-10 e IFN em vilos coriônicos humanos infectados por *T. gondii*.

4.6. Os tratamentos com *Pepinh-MYD* e *Pepinh-TRIF* juntamente com LPS alteram o parasitismo em células BeWo e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Numa terceira etapa de experimentos, após verificar susceptibilidade a infecção por *T. gondii* em células e vilos placentários mediante ativação de TLR4 por LPS, bem como a produção de citocinas consequente deste tratamento, nós buscamos avaliar quais papéis as vias intracelulares dependentes de TLR4 poderiam ter no parasitismo. Com este propósito, nós usamos peptídeos inibidores das proteínas intracelulares MyD88 e TRIF. Assim, o ensaio de β -galactosidase foi realizado com o objetivo de avaliar o índice de proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo, (Fig. 7) e vilos coriônicos humanos (Fig. 8), tratados com o peptídeo Pepinh-MYD, inibidor da sinalização de MyD88 e consequentemente bloqueador da via de TLR4, ou o peptídeo Pepinh-TRIF, inibidor de TRIF e também de sinalização dependente de TLR4. Em paralelo, peptídeos controle (Controle Pepinh-MYD e Controle Pepinh-TRIF) foram utilizados para excluir qualquer efeito deste tratamento específico com peptídeos nos resultados obtidos.

Células BeWo tratadas com Controle Pepinh-MYD ou Controle Pepinh-TRIF não mostraram qualquer alteração significativa na replicação de *T. gondii* quando comparado às células não tratadas (meio, Fig. 7A). No entanto, células BeWo tratadas com Pepinh-MYD reduziram significativamente a replicação do parasito quando comparado às células que receberam o respectivo peptídeo controle (Controle Pepinh-MYD), independentemente da presença de LPS concomitante ($P < 0.05$, Fig. 7A-B). Entretanto, quando o mesmo procedimento foi realizado com Pepinh-TRIF, ocorreu significativo aumento do número total de taquizoítos em comparação ao peptídeo controle (Controle-Pepinh-TRIF), independentemente do tratamento com LPS ($P < 0.05$, Fig. 7A-B). Estes dados demonstraram que a via de Myd88 não possuiu ação tão significativa ao combate do parasitismo no modelo de trofoblasto viloso BeWo, entretanto quando bloqueamos a via de TRIF, houve um aumento do parasitismo, nos levando a ressaltar que TRIF pôde exercer papel significativo ao combate do parasitismo em células BeWo.

Com relação as células JEG-3, o tratamento com Pepinh-MYD ou Pepinh-TRIF não induziu qualquer diferença significativa na proliferação de *T. gondii* em relação aos respectivos controles, independentemente do tratamento concomitante com LPS (Fig. 7C-D). Estes dados mostraram que nenhuma das vias intracelulares ativadas por TLR4 (MyD88 ou TRIF) influenciaram na susceptibilidade a infecção por *T. gondii* neste modelo de trofoblasto humano viloso, JEG-3. Nós observamos que, em células HTR-8/SVneo, o tratamento com o peptídeo controle Controle Pepinh-TRIF ou inibidor Pepinh-TRIF induziu redução da replicação de *T. gondii* em relação às células não tratadas (meio, $P < 0.05$, Fig. 7E). Em adição, nenhum efeito significativo foi observado para o peptídeo controle Controle Pepinh-MYD, entretanto o tratamento das células HTR-8/SVneo com o inibidor Pepinh-MYD reduziu significativamente a replicação parasitária quando comparado aos respectivos controles (meio e Controle Pepinh-MYD) na ausência de LPS ($P < 0.05$, Fig. 7E). Porém, na presença de LPS, nenhum efeito significativo dos inibidores de MyD88 ou TRIF foi observado em relação aos respectivos controles (Fig. 7F).

Finalmente, com relação ao vilo coriônico humano, após 24 horas de tratamento, observou-se que não houve diferença significativa no parasitismo em nenhuma condição onde foram utilizados apenas os peptídeos Pepinh-MYD ou Pepinh-TRIF (Fig. 8A). Entretanto, observou-se que quando MyD88 foi bloqueado pelo peptídeo inibidor na

presença de LPS, um significativo aumento na proliferação de *T. gondii* foi detectada quando comparado ao respectivo controle ($P < 0.05$, Fig. 8B). Não foram observadas diferenças significantes entre o respectivo controle e o inibidor da via de TRIF com presença de LPS em vilos coriônicos humanos (Fig. 8B).

5. DISCUSSÃO

Toll-like receptor (TLRs) são receptores que induzem a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias para desencadear uma resposta imune eficiente contra patógenos (ASHOUR et al., 2015). Estudos demonstram que TLR4 desempenha importante papel na patogênese de diversas doenças infecciosas como a hepatite B, desde que sua ativação é capaz de reprimir o vírus em diversas linhagens celulares (DAS et al., 2016). Em adição, TLR4 mostra-se também importante na artrite reumatoide (AR), quando sua ativação induz liberação de citocinas pró-inflamatórias, (LI et al., 2014), ou na sepse grave e no choque séptico, onde a ativação de TLR4 e consequente fosforilação de NF- κ b pode ocasionar exacerbada inflamação, tornando estes mediadores inflamatórios importantes alvos terapêuticos na terapia da sepse (WITTEBOLE et al., 2010). Portanto, neste presente estudo, nós avaliamos a participação funcional de TLR4 na infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos humanos coriônicos de terceiro trimestre gestacional.

Inicialmente, nós verificamos o efeito da ativação de TLR4 por LPS com 24 e 48h em linhagens celulares humanas transformadas de citotrofoblasto, BeWo e JEG-3, e trofoblasto extraviloso, HTR-8/SVneo, além de explantes de vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional infectados com taquizoítos de *T. gondii*. Nós observamos que a ativação de TLR4 por LPS em células BeWo, independentemente do tempo de tratamento, promoveu redução significativa no número total de taquizoítos. Portanto, a ativação de TLR4 foi eficiente no controle da infecção nesta linhagem celular BeWo. Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio que demonstrou que células BeWo expressam nove dos dez TLRs amplamente conhecidos, dentre eles TLR4 (GIERMAN et al., 2015). No entanto, em células JEG-3, não foi possível observar diferença significativa na proliferação intracelular do parasito quando as células foram tratadas com LPS por 24 h, mas quando a via de TLR4 foi estimulada por 48 h, houve significativo aumento do número total de taquizoítos. Assim, é possível concluir que a ativação de TLR4 em células JEG-3 não foi eficiente no controle do parasitismo. Esses resultados estão de acordo com um estudo prévio que demonstrou que células JEG-3 expressam níveis menores de TLRs (GIERMAN et al., 2015). Nós verificamos também que células HTR-8/SVneo não demonstraram diferença no crescimento de *T. gondii* em nenhum dos tratamentos com LPS, sugerindo que a via de TLR4 não foi ativada nesse tipo de linhagem celular. Estudos corroboram com nossa hipótese, pois foi

relatado que linhagens celulares que são transfectadas com o vírus SV40, como a HTR-8/SVneo, são mais restritas na expressão de TLRs quando comparado às linhagens de trofoblasto derivadas de coriocarcinoma. Em adição, o mesmo estudo relatou que LPS não estimula uma resposta eficiente na modulação de citocinas nesse tipo celular HTR-8/SVneo (GIERMAN et al., 2015). Considerando os dados de proliferação de *T. gondii* nestas três linhagens celulares humanas de trofoblasto, pode-se concluir que BeWo responde a ativação de TLR4 reduzindo a replicação de *T. gondii*, e HTR-8/SVneo e JEG-3 não ativam eficientemente TLR4, uma vez que não alteraram ou aumentaram o crescimento do parasito, respectivamente. Estes resultados demonstram que linhagens celulares humanas de trofoblasto podem responder distintamente à infecção por *T. gondii* quando submetidas aos mesmos tratamentos e/ou estímulos para ativação de TLR4.

Em uma segunda etapa de experimentos, nós buscamos avaliar o efeito da ativação de TLR4 na proliferação de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional. O tratamento com LPS induziu significativo decréscimo na replicação do parasito, principalmente no tempo de 48h. Portanto, a ativação de TLR4 se mostra importante no controle da infecção por *T. gondii* em vilos placentários de terceiro trimestre. Estudos demonstram que TLR4 é altamente expresso em vilosidades coriônicas periféricas, de modo que a expressão TLR4 pode ser interpretada, pelo menos em parte, como um mecanismo de proteção inata da interface materno-fetal contra invasão de microorganismos patogênicos durante o período gestacional (HOLMLUND et al., 2002). Além do mais, a ativação de TLR4 na placenta resulta em uma resposta imune clássica, caracterizada pela indução da produção de uma variedade de citocinas (ABRAHAMS et al., 2004).

Após observarmos os diferentes índices de proliferação intracelular de *T. gondii* em células trofoblásticas vilosas (BeWo e JEG-3), extravilosas (HTR-8/SVneo) e explantes de vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional tratados com LPS, foi possível concluir que modelos experimentais diferentes de células trofoblásticas respondem distintamente a LPS. Isto significa que linhagens celulares humanas que se comportam como trofoblasto viloso ou extraviloso apresentam respostas diferentes à ativação de TLR4. No intuito de aprimorar o modelo experimental de ativação de TLR4 durante infecção por *T. gondii* em trofoblasto humano, nós usamos vilos placentários de terceiro trimestre como o melhor modelo de interface materno-

fetal e verificamos redução da infecção. Portanto, células BeWo correspondem a uma linhagem celular trofoblástica que mais se assemelha a resposta observada em vilos coriônicos, tornando-as como melhor modelo experimental de trofoblasto para se avaliar ativação de TLR4 e infecção por *Toxoplasma*.

Numa terceira etapa de experimentos, após verificar o efeito de LPS no parasitismo nos quatro modelos experimentais de interface materno-fetal, foi realizado o ensaio ELISA no sobrenadante das células e vilos para avaliar o perfil de citocinas induzido pela ativação de TLR4. Nossos resultados demonstraram que houve diminuição de TGF- β 1 e IL-10 em células BeWo, aumento de TGF- β 1 e redução de IL-10 em células JEG-3 e vilos placentários, bem como redução de TGF- β 1 e aumento de IL-10 em células HTR-8/SVneo. Estudos demonstram que diferentes isoformas de TGF- β são expressas na interface materno-fetal, sendo a isoforma TGF- β 1 a mais abundante no citotrofoblasto humano (SAITO, 2000). Nossos estudos prévios mostraram que células BeWo tratadas com as formas recombinantes de TGF- β 1 e IL-10 aumentaram significativamente a invasão e proliferação de *T. gondii* (BARBOSA et al., 2008), de um modo dependente das vias de sinalização intracelulares desencadeadas por Smad-3 e STAT-3, respectivamente (BARBOSA et al., 2015). Outros estudos com células BeWo também sugeriram que IL-10 está envolvida no curso da infecção por *T. gondii* (JEONG et al., 2016). Fenoy e colaboradores (2012) demonstraram que *T. gondii* é capaz de gatilhar os efeitos imunomodulatórios de TGF- β 1 para evadir da resposta imune do hospedeiro. Em adição, alguns estudos comprovam que modificações genéticas no gene de IL-10 podem ocasionar aumento nos riscos de transmissão congênita da infecção por *T. gondii* (WUJCICKA et al., 2018). Portanto, TGF- β 1 e IL-10 são citocinas regulatórias consideradas potenciais fatores de risco durante uma infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal (ZARE-BIDAKI et al., 2016). Portanto, é possível especular que os níveis reduzidos de TGF- β 1 e IL-10 em células BeWo, bem como a menor produção de IL-10 em vilos placentários, podem estar envolvidos no controle da infecção por *T. gondii* nestes dois modelos experimentais.

Sabe-se que concentrações balanceadas de TNF são essenciais para o sucesso gestacional, auxiliando, por exemplo, na angiogênese. Entretanto, altos níveis séricos dessa citocina estão associados a várias complicações durante a gestação, como hipertensão gestacional e diabetes mellitus gestacional (SIWETZ et al., 2016). Observamos em nossos resultados que houve redução na secreção de TNF em células

BeWo e HTR-8/SVneo, bem como em explantes de vilos coriônicos humanos tratados com LPS e, ao mesmo tempo, nossos dados mostraram menor crescimento do parasito em BeWo e vilos. Já é amplamente aceito que TNF é uma citocina pró-inflamatória importante na patogênese de diversas doenças (BRADLEY et al., 2008). TNF é crítico para o combate de patógenos como *Francisella tularensis* (COWLEY et al., 2007) e *T. gondii* (DONAHOE et al., 2017), inclusive em células BeWo (BARBOSA et al., 2015). A menor secreção de TNF não proporcionou maior susceptibilidade à infecção nestes modelos experimentais BeWo e vilos, podendo ser, portanto, um mecanismo de proteção ao trofoblasto na tentativa de evitar uma resposta pró-inflamatória exacerbada, preservando o perfil imunológico tolerante durante a gestação. Alguns estudos demonstram que o aumento de TNF afeta a biologia do trofoblasto, incluindo atividade migratória, sincicialização e função endócrina (BAUER et al., 2004). Yui e colaboradores (1994) mostraram que um aumento de TNF ocasiona maior índice de apoptose e citotoxicidade do trofoblasto, inibindo a sua capacidade invasiva. Além do mais, quando TNF está aumentado em placentas provenientes de mulheres com pré-eclâmpsia pode contribuir para o estresse oxidativo, levando a complicações graves durante a gestação (WANG et al., 1996). Portanto, esses inúmeros estudos corroboram com nossos resultados, uma vez que houve uma diminuição de TNF em BeWo e vilos, nos levando a concluir que esse é um mecanismo protetor utilizado pelo trofoblasto para amortecer os processos inflamatórios causados pela infecção por *T. gondii* no espaço materno-fetal.

Por outro lado, sabe-se que IL-1 é um potente indutor de TNF em células citotrofoblásticas, sendo IL-1 β altamente expressa no primeiro trimestre gestacional, mas produzida em baixos níveis pelo trofoblasto no terceiro trimestre, entretanto, quando esse microambiente sofre algum estímulo, como uma infecção por algum patógeno, por exemplo *T. gondii*, pode-se induzir grandes quantidades de TNF por IL-1, podendo aumentar as reações inflamatórias, bem como os efeitos citotóxicos dessa citocina no trofoblasto (KNÖFLER et al., 1997; TAVAKKAOL et al., 2016). Esses achados condizem com nossos resultados, caracterizando aumento de TNF na ativação da via de TLR4 em células JEG-3, podendo este ser um mecanismo do trofoblasto em tentar controlar a parasitemia. Entretanto, devemos considerar que células JEG-3 também produziram altas quantidades de TGF- β 1 em paralelo a TNF, o que tornou ineficiente o combate do parasitismo nesse modelo celular.

Nossos resultados mostraram também que, quando a via de TLR4 é ativada, houve um aumento da produção de IFN- γ em todas as linhagens celulares e no vilos coriônico humano. Sabe-se que essa citocina desempenha importante papel em diversos processos celulares, incluindo a ativação da resposta imune inata e adaptativa, sendo também crucial na resposta imune contra diversos patógenos (MURPHY et al., 2009), incluindo *T. gondii* durante o estágio agudo da infecção (SUZUKI et al., 2011). Macrófagos ativados por IFN- γ inibem a replicação do parasita através de vários mecanismos microbicidas potentes, como os mecanismos oxidativos (HUGHES et al., 1988), estando relacionado também com a apoptose em células trofoblásticas infectadas por *T. gondii*, entretanto, seu papel é crucial para a regulação da parasitemia (ZHANG et al., 2016). Assim, de acordo com nossos resultados, e com estudos anteriores, o aumento da secreção de IFN- γ após a ativação da via de TLR4 é fundamental para o combate do parasitismo, entretanto, pode causar prejuízos na relação materno-fetal.

Considerando todos os dados de produção de citocinas mediante ativação de TLR4 por LPS, é possível concluir que TLR4 é ativado em células BeWo e vilos coriônicos reduzindo os níveis de IL-10 ou TGF- β , e aumentando as concentrações de IFN- γ , proporcionando menor proliferação de *T. gondii*, entretanto menor liberação de TNF pode amenizar os efeitos deletérios de uma reação pró-inflamatória exacerbada. Assim, pode-se considerar células BeWo e vilos placentários os modelos experimentais de interface materno-fetal mais fidedignos em estudos de ativação de TLRs e infecção por *T. gondii* na gestação. Por outro lado, mesmo com produção estimulada de citocinas, células JEG-3 e HTR-8/SVneo não controlam a replicação parasitária mediante estímulo de receptores da imunidade inata.

Em nossos resultados, foi observado também aumento de IL-6, MIF e IL-8 em células BeWo, aumento de IL-6 e IL-8 em HTR-8/SVneo, aumento de IL-6 e MIF em JEG-3 e diminuição de IL-8 e MIF em vilos coriônicos, independente da presença de LPS. IL-6 e MIF são citocinas envolvidas no controle da infecção por *T. gondii* em vários tipos celulares, como macrófagos e monócitos (PEREIRA et al., 2019), e trofoblastos humano e murino (GOMES et al., 2011; BARBOSA et al., 2014, BARBOSA et al., 2015, DA SILVA et al., 2017). IL-6 também está associada a diversos mecanismos chaves para a regulação da resposta imune, incluindo inflamação, proliferação, migração e apoptose, sendo essenciais para o desenvolvimento placentário e para uma gestação normal (NAKA et al., 2002, DA SILVA et al., 2017). Em suma, é

possível especular que MIF e IL-6 foram importantes no combate do parasitismo em células BeWo. Já em células JEG-3 houve aumento considerável dessas citocinas, entretanto, não foram capazes de ser efetivas ao combate do parasitismo. E, apesar da menor secreção de MIF em vilos, a resposta imune destes vilos à infecção não foi prejudicada. IL-8 é uma citocina com papel pró-inflamatório, estando presente em mulheres com distúrbios gestacionais como a pré-eclâmpsia (SUN et al., 2016). Estudos sugerem que a liberação de IL-8 é uma importante resposta da célula hospedeira contra a infecção ativa por *T. gondii*. (DENNEY et al., 1999). Esses resultados nos levam a concluir que a presença de IL-8 em células BeWo, mas não em células JEG-3 e em vilos coriônicos, foi um importante mediador afim de tentar controlar a parasitemia nessas linhagens.

Finalmente, nós buscamos avaliar quais papéis as vias intracelulares dependentes de TLR4 poderiam ter no parasitismo quando estas vias fossem bloqueadas. Sabe-se que TLR4 é singular entre a família dos TLRs, sendo capaz de ativar tanto a sinalização de Myd88 quanto a de TRIF (KAGAN et al., 2008).

Nossos resultados sugeriram que, em células BeWo, a via de Myd88 não possui ação tão significativa ao combate de *T. gondii* uma vez que, quando essa via foi bloqueada, houve diminuição do parasitismo. Entretanto, quando a via de TRIF foi inibida, o crescimento parasitário aumentou significativamente em células BeWo, sugerindo que nesse modelo celular a via de TRIF foi mais eficiente ao combate da infecção. Vários estudos demonstram a eficiência da sinalização de TRIF na transcrição de vários fatores importantes para a resposta imune, como a transcrição de NF- κ B, IRF-3 e AP-1 levando a produção de citocinas como IFN do tipo 1 e a maturação de células dendríticas mielóides (OSHIUMI et al., 2003). Em adição, a sinalização dependente de TLR4 e TRIF possui a capacidade de amenizar doenças alérgicas das vias aéreas (SHALABY et al., 2017), tem ação eficiente contra a infecção pelo vírus da influenza H5N1 (SHINYA et al., 2012), e promove resposta inflamatória intra-ocular contra a infecção bacteriana causada por *Bacillus cereus*, (PARKUNAN et al., 2015). Todos esses achados nos sugerem que, na infecção por *T. gondii* em células BeWo, a via de sinalização TLR-4-TRIF, mas não TLR4-Myd88, foi mais eficiente ao controle do parasitismo. Em células JEG-3 os resultados nos mostraram que não houve indução de qualquer diferença significativa na proliferação de *T.gondii*, e esses dados estão de acordo com um estudo que demonstrou que células JEG-3 expressam níveis reduzidos

de TLR4 (GIERMAN et al., 2015). Em células HTR-8/SVneo, nenhuma das vias de TLR4 (Myd88/TRIF) influenciou de modo significativo no controle da infecção por *T.gondii*. Um estudo mostrou que células que são transfectadas com o vírus SV40, como a linhagem utilizada, são mais restritas ao gene de expressão para TLR4, e mais responsivas ao gene TLR3 (GIERMAN et al., 2015). Outro estudo demonstra que células trofoblásticas apresentam susceptibilidade variável a infecção por *T. gondii*, pode ser que a via de TLR4 influencia nessas células a maior ou menos susceptibilidade a infecção (ANDER et al., 2018).

Contrariamente ao observado para as linhagens celulares, explantes de vilos coriônicos demonstraram que a via de Myd88 foi essencial ao controle da parasitemia, e não a via de TRIF. Sabe-se que TLR4 está presente na interface materno-fetal (BEIJAR et al., 2006; YUEHONG et al., 2006), e que a sinalização de Myd88 é fundamental para uma resposta imune eficiente contra alguns patógenos, como *Plasmodium*, quando Myd88 se torna fundamental na resposta imunológica inata durante malária placentária (BARBOZA et al., 2019). Além do mais, TLR-4-Myd88 pode ser usado como um biomarcador para avaliar o prognóstico e orientar o tratamento de pacientes com câncer de mama (WU et al., 2018), ou seja, nossos resultados corroboram com estudos anteriores, que afirmam que a via de Myd88 é fundamental para uma resposta imune eficiente. Em suma, vilos placentários e células BeWo respondem a ativação de TLR4 por vias intracelulares diferentes, sendo dependentes de MyD88 e TRIF, respectivamente, apesar de induzirem significativo controle da infecção por *T. gondii*. Portanto, é possível concluir que a interface materno-fetal responde ativamente a *Toxoplasma* por intermédio de receptores de reconhecimento padrão, como TLR4, podendo ser considerada um elemento chave da resposta imune inata ou inicial contra patógenos invasores.

A toxoplasmose congênita pode ser estudada através de vários modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo*. Estudos *in vitro* podem ser recriminados por serem muito diferentes do ambiente natural, no entanto apresentam diversas vantagens, como pesquisar o papel funcional de um tipo celular ou tecidual específico sem a interferência sistêmica do organismo (MOLEIRO et al., 2017). Cultura celulares são exemplos notórios de estudos *in vitro*, um estudo recente de nosso grupo de pesquisa mostrou que dois medicamentos, enrofloxacin e toltrazuril, são capazes de controlar a infecção por *T. gondii* em células BeWo e também em modelos *ex vivo*, os explantes de vilos

coriônicos humanos (DA SILVA et al., 2017), o que reforça que células BeWo são os modelos celulares de trofoblasto mais próximos das condições *ex vivo*, como visto com relação a resposta a ativação de TLR4 neste presente trabalho. Outro estudo do nosso grupo, também em modelos de células BeWo, demonstrou que essas células apresentam alta infectividade por *T.gondii* quando tratadas com IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ , sugerindo que essas citocinas desencadeiam modulações negativas que amortecem uma resposta imune contra *T. gondii* (BARBOSA et al., 2015). Todos esses achados demonstram que estudos *in vitro* são importantes e que trazem resultados satisfatórios, porém apenas mimetizam o ambiente fisiológico. Com isso, ressalta-se a importância de estudos *ex vivo* para uma melhor compreensão daquilo que é estudado, fazendo uso, por exemplo, dos vilos placentários em paralelo às linhagens celulares. Vários modelos *ex vivo* são utilizados, e atualmente, vários estudos com placenta humana são realizados, a fim de trazer uma ampla compreensão das relações materno-fetal. Um estudo recente demonstrou que a infecção *ex vivo* de explantes de vilos coriônicos humanos por *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii* induziu a ativação de diferentes TLRs, além de perfis de citocinas e quimiocinas, demonstrando a diferença das susceptibilidades da placenta para ambos os parasitas (CASTILLO et al., 2017). Em conjunto, nossos achados demonstram que a via de TLR4 foi essencialmente importante para o controle da proliferação de *T. gondii* no modelo celular BeWo e em vilos coriônicos humanos, entretanto modelos *in vitro* responderam a TLR4 diferentemente de modelos *ex vivo* com relação a produção de citocinas e ativação de vias intracelulares. Em adição, receptores do tipo TLR4 podem ser futuros alvos para formas alternativas de tratamento e/ou prevenção da toxoplasmose congênita.

6. CONCLUSÕES

A análise sintética de nossos dados nos permite concluir que:

- *Toll-like receptor 4* é um receptor da imunidade inata importante no controle da proliferação de *T. gondii* em trofoblasto humano;
- Células transformadas comportam-se diferentemente uma das outras, entretanto, células BeWo são modelos experimentais que mais se assemelham de vilos placentários;
- Modelos *in vitro* responderam a TLR4 diferentemente de modelos *ex vivo* com relação a produção de citocinas e ativação de vias intracelulares;
- As citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 tiveram papel fundamental na modulação da parasitemia.

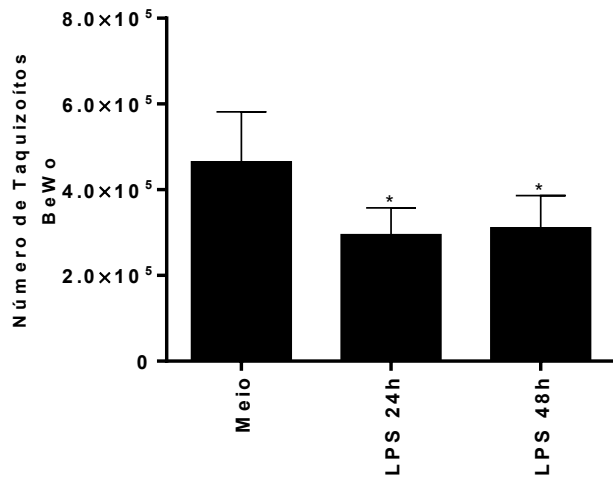
7. FIGURAS

Figura 1. Proliferação intracelular de *T. gondii* (linhagem RH, clone 2F1) em células BeWo, JEG-3 e HTR-8 / SVneo tratadas ou não com LPS.

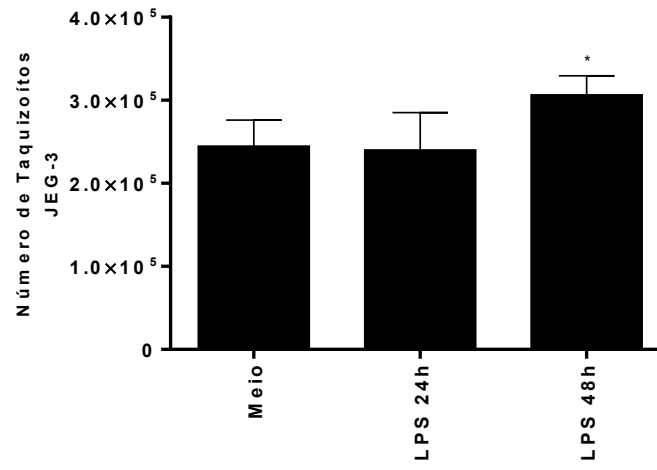
Células BeWo (A), JEG-3 (B) e HTR-8 / SVneo (C) foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h). As células foram submetidas ao ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (ensaio de β -galactosidase). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número total de taquizoítos em relação à curva padrão dos taquizoítos livres. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni. Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (média) ($*P < 0,05$). Três experimentos independentes foram realizados em doze repetições.

Figura 1.

A



B



C

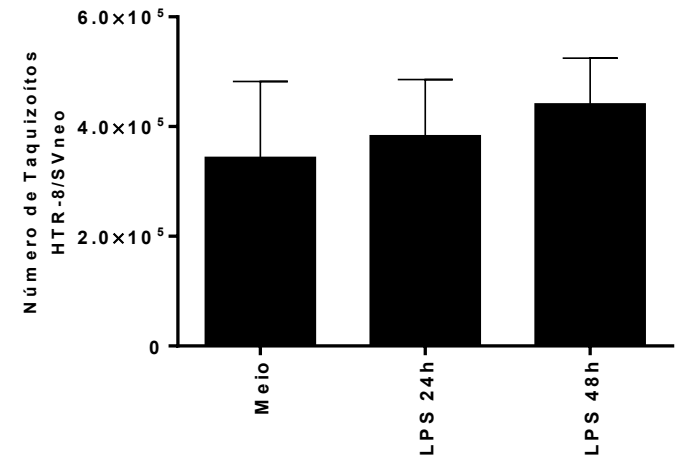


Figura 2. Proliferação intracelular de *T. gondii* (linhagem RH, clone 2F1) em explantes de vilosidades coriônicas humanas tratadas ou não com LPS.

As vilosidades foram coletadas e cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h) ou 24 h infecção e 48 h tratamento com LPS (LPS 48h). Os explantes vilosos foram macerados e submetidos ao ensaio de β -galactosidase. Os dados foram expressos como média \pm SEM do número total de taquizoítos em relação à curva padrão dos taquizoítos livres. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni. Diferença significativa em relação às células não tratadas e infectadas (*T. gondii*) (* $P < 0,05$). Quatro experimentos independentes foram realizados em dezesseis repetições.

Figura 2.

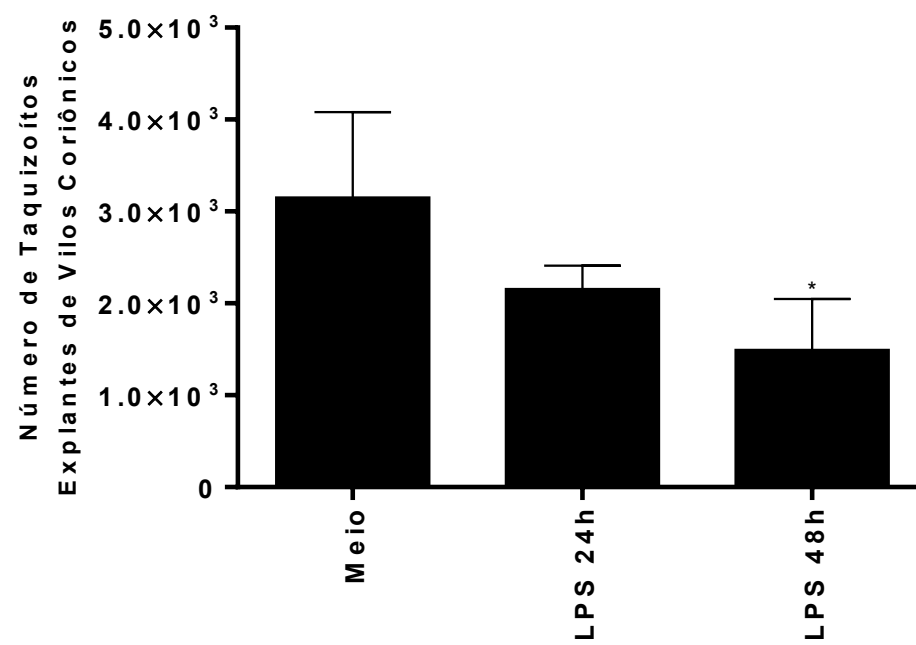


Figura 3. Produção de citocinas em células BeWo infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com LPS.

Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as células BeWo não foram infectadas e não tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram TGF- β 1 (**A**), IL-10 (**B**), TNF (**C**) e IFN- γ (**D**). Os resultados foram 25 expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às células não tratadas e não infectadas (meio, * $P < 0,05$), células infectadas e não tratadas (meio + *T. gondii*, # $P < 0,05$), não infectadas e células tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$), ou infectadas e células tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h + *T. gondii*, § $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni, ou Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em doze repetições.

Figura 3.

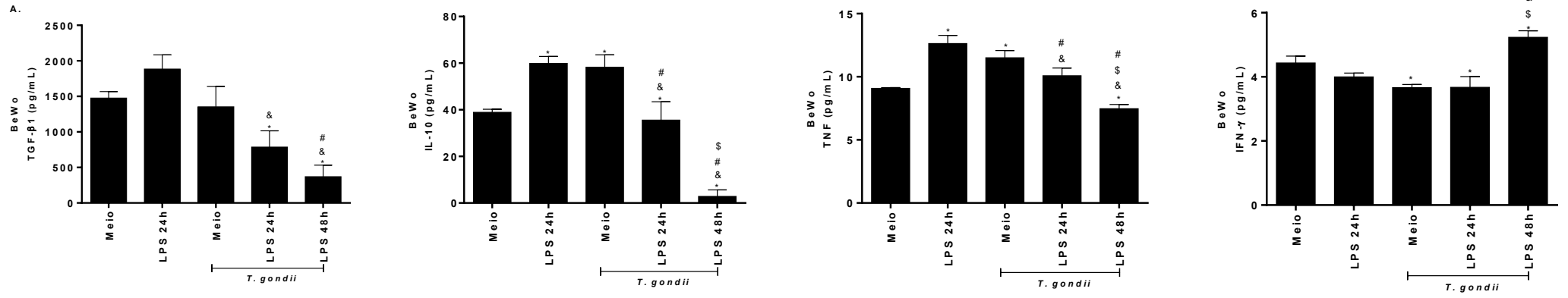


Figura 4: Produção de citocinas em células JEG-3 infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com LPS.

Células JEG-3 foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou infecção de 24 h e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as células JEG-3 não foram infectadas e não tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram TGF- β 1 (**A**), IL-10 (**B**), TNF (**C**) e IFN- γ (**D**). Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às células não tratadas e não infectadas (meio, * $P < 0,05$), células infectadas e não tratadas (meio + *T. gondii*, # $P < 0,05$), não infectadas e células tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$), ou infectadas e células tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h + *T. gondii*, § $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni ou Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em doze repetições.

Figura 4.

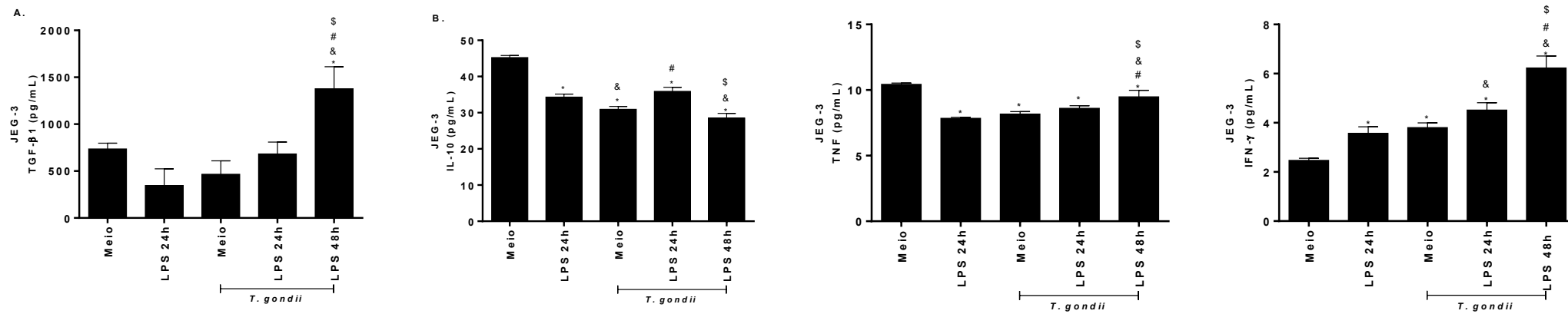


Figura 5: Produção de citocinas em células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com LPS.

Células HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as células HTR-8/SVneo não foram infectadas e não tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram TGF- β 1 (**A**), IL-10 (**B**), TNF (**C**), IFN- γ (**D**) e MIF (**E**). Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às células não tratadas e não infectadas (meio, * $P < 0,05$), células infectadas e não tratadas (meio + *T. gondii*, # $P < 0,05$), não infectadas e células tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni ou Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em dezesseis repetições.

Figura 5.

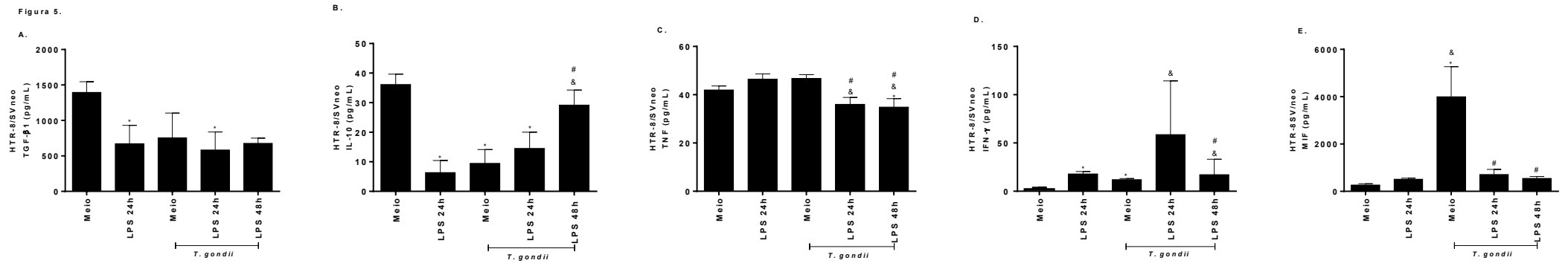


Figura 6. Produção de citocinas em explantes vilosos humanos infectados por *T. gondii* e tratados ou não com LPS.

Os explantes vilosos humanos foram cultivados em placas de 96 poços, tratados ou não com LPS por 24 h, infectados por *T. gondii* e tratados ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as vilosidades humanas não foram infectadas e não foram tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram TGF- β 1 (**A**), IL-10 (**B**), TNF (**C**) e IFN- γ (**D**). Os resultados foram expressos em pg / μ g de acordo com a curva padrão para cada citocina analisados. Diferenças significativas em relação às vilosidades não tratadas e não infectadas (médias, * $P < 0,05$), vilosas infectadas e não tratadas (médias + *T. gondii*, # $P < 0,05$), não infectadas e tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$) ou infectadas e vilosidades tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h + *T. gondii*, § $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni ou Kruskall Wallis quando apropriado. Quatro experimentos independentes foram realizados em dezesseis replicatas

Figura 6.

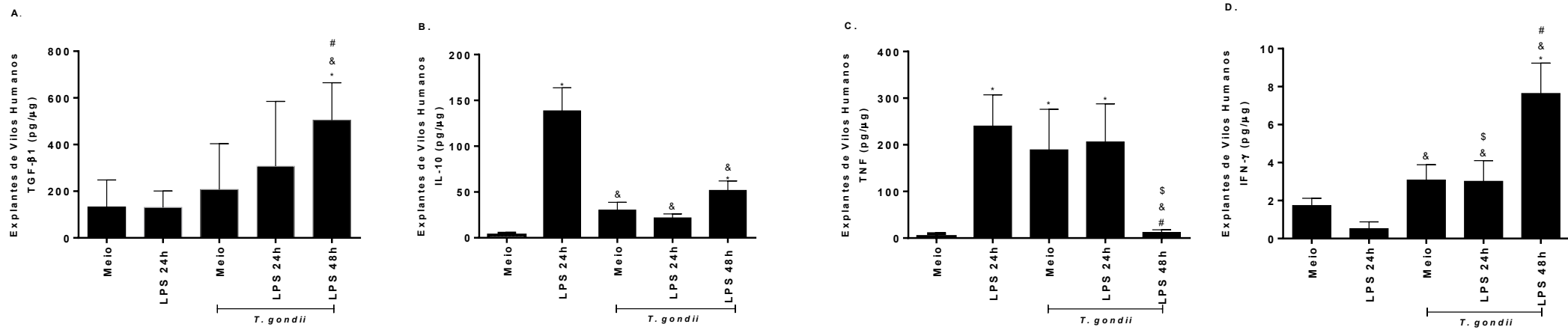
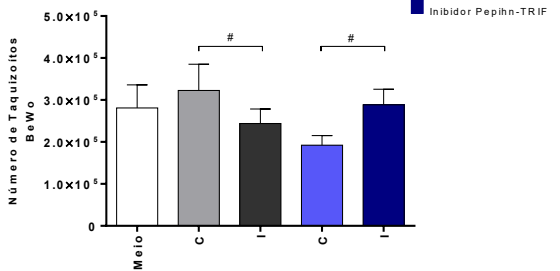


Figura 7. Proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, JEG-3 e HTR-8/SVneo tratadas ou não com inibidores de LPS e MyD88 ou TRIF.

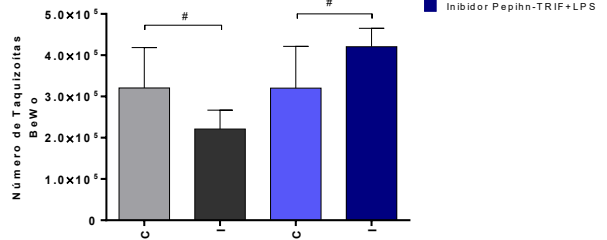
Células BeWo (A, B), JEG-3 (C, D) e HTR-8/SVneo (E, F) foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com peptídeos LPS e inibidores (Pepinh-MYD ou Pep-TRIF) ou os respectivos controles (Control Pepinh-MYD ou Control Pepinh-TRIF). Após 6 h, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e mantidas em cultura por mais 24 h. Posteriormente, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (ensaio de β -galactosidase). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número total de taquizoítos em relação à curva padrão dos taquizoítos livres. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni e Kruskal Wallis quando apropriado. Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (médio) ($*P < 0,05$), ou células tratadas com inibidores e o respectivo controle ($\#P < 0,05$). Dois experimentos independentes foram realizados em seis repetições.

Figura 7.

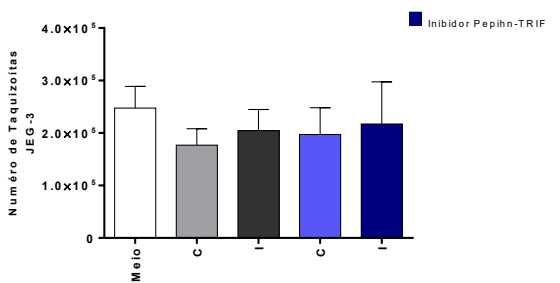
A.



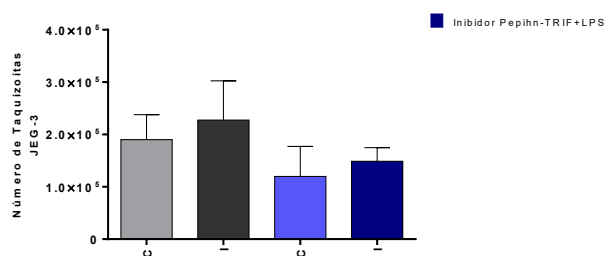
B.



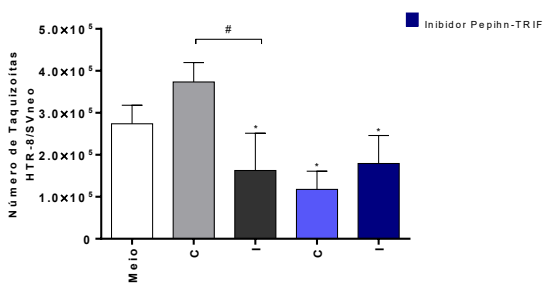
C.



D.



E.



F.

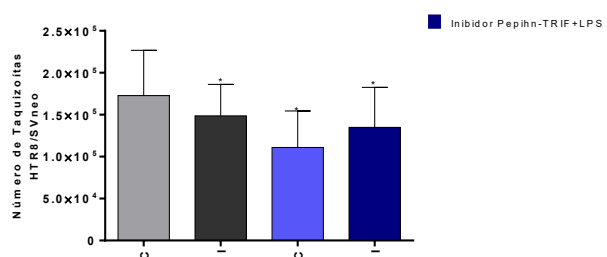
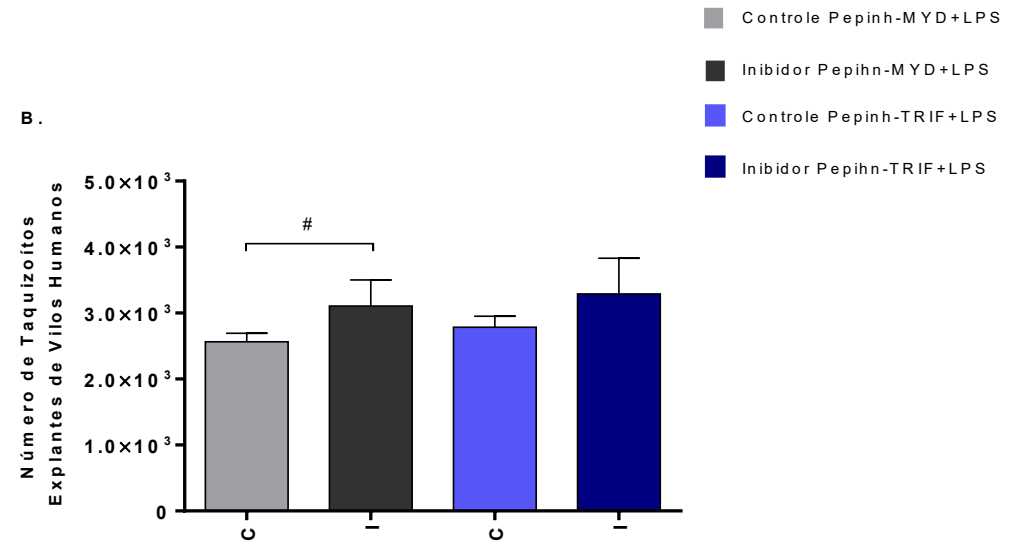
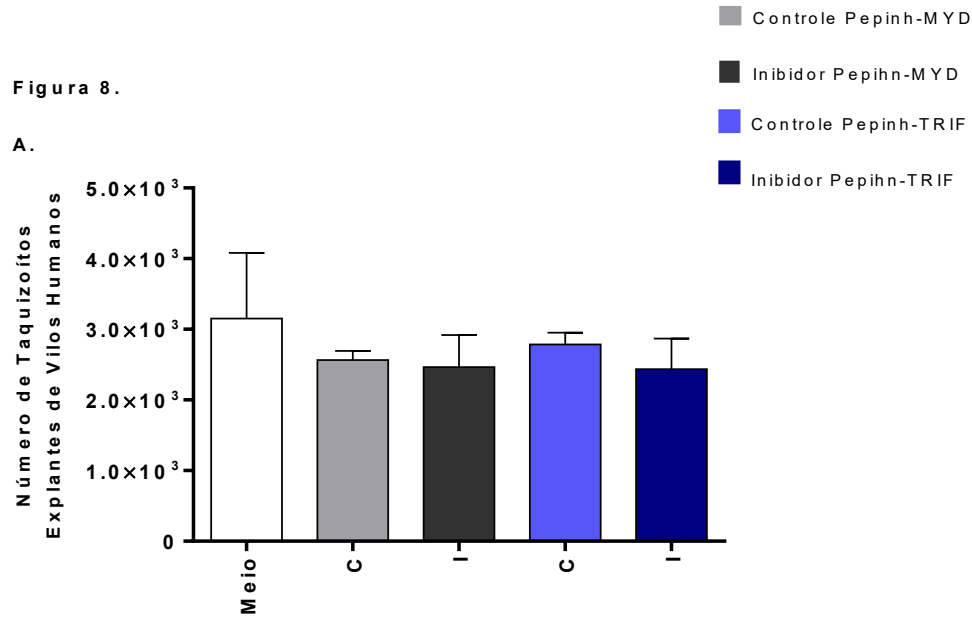


Figura 8. Proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes vilosos humanos tratados ou não com inibidores de LPS e MyD88 ou TRIF.

Os explantes vilosos humanos foram cultivados em placas de 96 poços, não tratados (**A**) ou tratados (**B**) com LPS e inibidores peptídicos (Pepinh-MYD ou Pepinh-TRIF) ou os respectivos controles (Control Pepinh-MYD ou Control Pepinh-TRIF). Após 6 h, as vilosidades foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e mantidas em cultura por mais 24 h. Posteriormente, as vilosidades foram submetidas ao ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (ensaio de β -galactosidase). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número total de taquizoítos em relação à curva padrão dos taquizoítos livres. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni ou Kruskal Wallis quando apropriado. Diferenças significativas em relação às vilosidades infectadas e não tratadas (média) (* $P < 0,05$), ou vilosidades tratadas com inibidores (**I**) e o respectivo controle (**C**) (# $P < 0,05$). Um experimente independente foi realizado em seis repetições.

Figura 8.



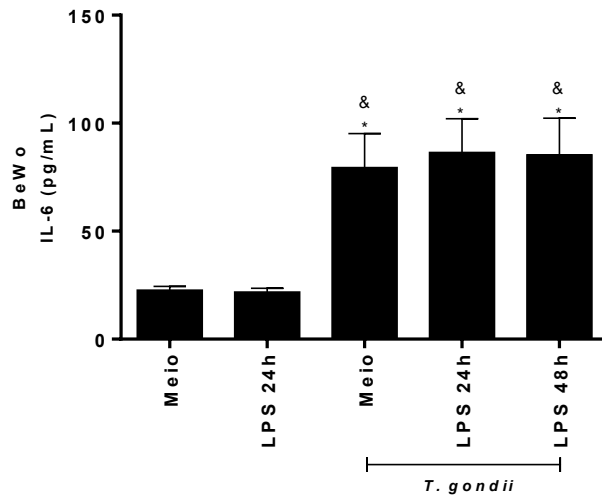
8. FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura suplementar 1: Produção de citocinas em células BeWo infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com LPS.

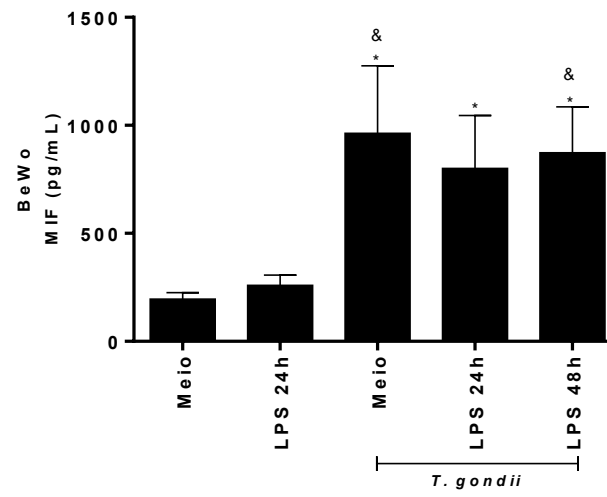
Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as células BeWo não foram infectadas e não tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram IL-6 (**A**), MIF (**B**) e IL-8 (**C**). Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às células não tratadas e não infectadas (meio, * $P < 0,05$), ou células não infectadas e tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni e Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em doze repetições.

Figura Suplementar 1.

A.



B.



C.

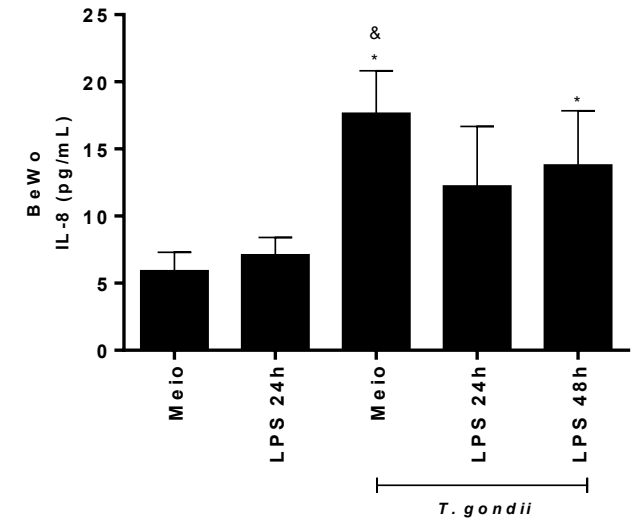
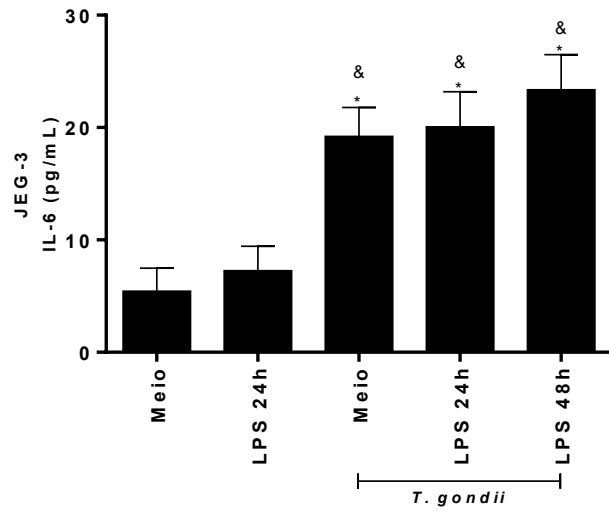


Figura suplementar 2: Produção de citocinas em células JEG-3 infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com LPS.

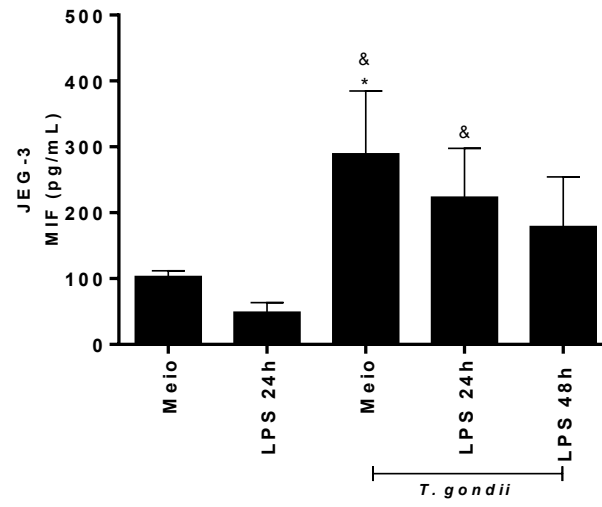
Células JEG-3 foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou infecção de 24 h e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as células JEG-3 não foram infectadas e não tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram IL-6 (**A**), MIF (**B**) e IL-8 (**C**). Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às células não tratadas e não infectadas (meio, * $P < 0,05$), ou células não infectadas e tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni e Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em doze replicatas.

Figura Suplementar 2.

A.



B.



C.

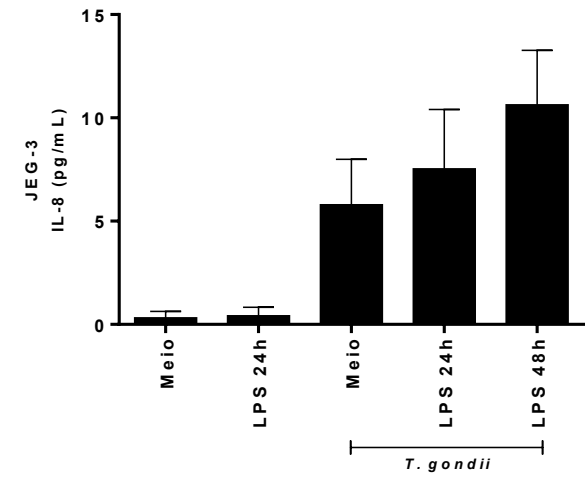
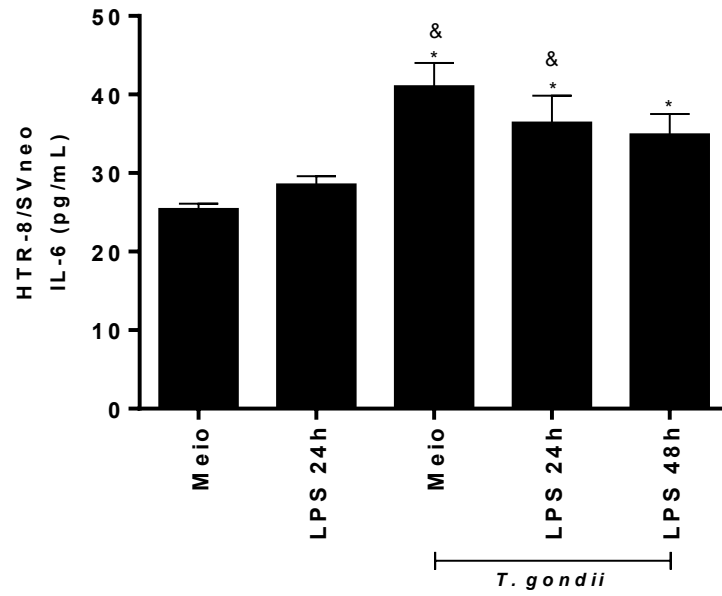


Figura suplementar 3: Produção de citocinas em células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não com LPS.

Células HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas ou não com LPS por 24 h, infectadas por *T. gondii* e tratadas ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, as células HTR-8/SVneo não foram infectadas e não tratadas com LPS (meio), ou não infectadas e tratadas com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram IL-6 (A) e IL-8 (B). Os resultados foram expressos em pg / mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às células não tratadas e não infectadas (meio, * $P < 0,05$), ou células não infectadas e tratadas com LPS (LPS 24h, & $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni e Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em doze repetições.

Figura Suplementar 3.

A.



B.

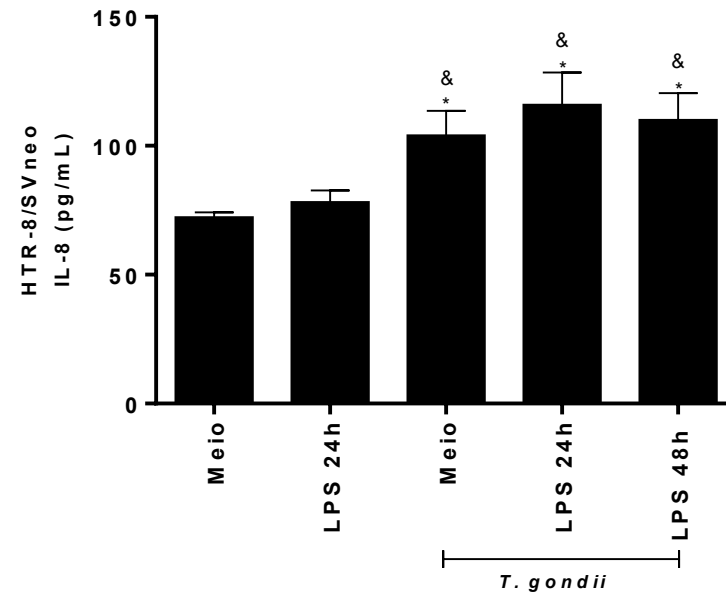
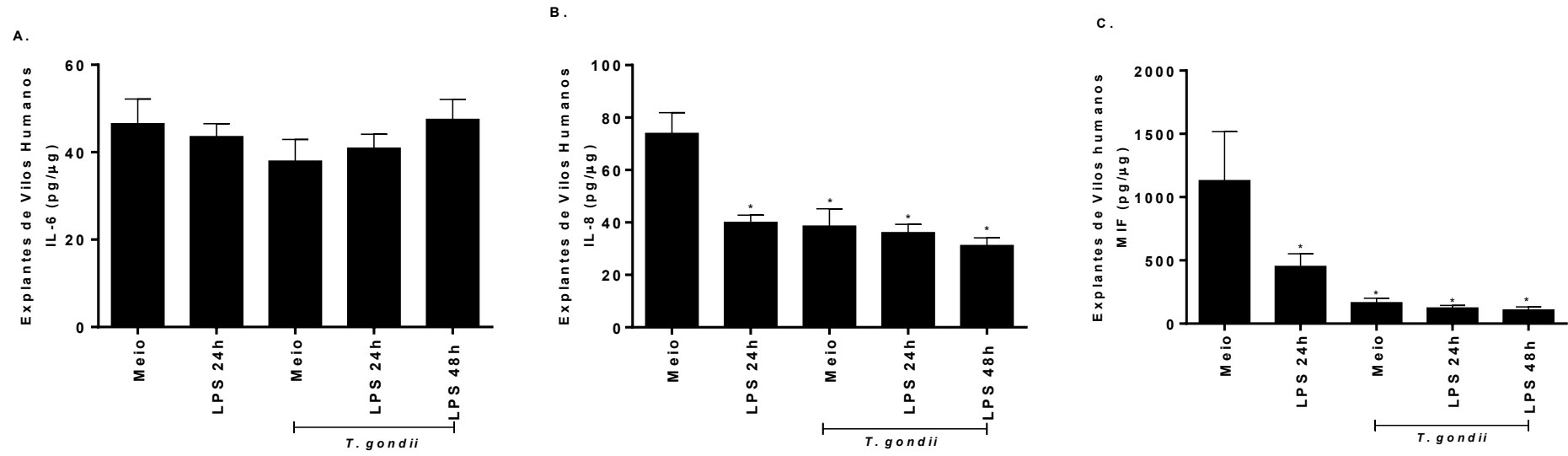


Figura suplementar 4: Produção de citocinas em explantes vilosos humanos infectados por *T. gondii* e tratados ou não com LPS.

Os explantes vilosos humanos foram cultivados em placas de 96 poços, tratados ou não com LPS para 24 h, infectados por *T. gondii* e tratados ou não novamente com LPS, totalizando 24 h de infecção e 24 h de tratamento com LPS (LPS 24h + *T. gondii*) ou 24 h de infecção e 48 h de tratamento com LPS (LPS 48h + *T. gondii*). Como controle, vilosidades humanas não foram infectados e não tratados com LPS (meio), ou não infectados e tratados com LPS por 24 h (LPS 24h). Subsequentemente, os sobrenadantes foram recolhidos para medição de citocinas por ELISA. As citocinas medidas foram IL-6 (A), IL-8 (B) e MIF (C). Os resultados foram expressos em pg / µg de acordo com a curva padrão cada citocina analisada. Diferenças significativas em relação às vilosas não tratadas e não infectadas (média, * $P < 0,05$). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA com o teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni e Kruskal Wallis quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados em doze repetições.

Figura Suplementar 4.



REFERÊNCIAS

- ANDER, E.S. et al. Human Placental Syncytiotrophoblasts Restrict *Toxoplasma gondii* Attachment and Replication and Respond to Infection by Producing Immunomodulatory Chemokines. **mBio.**, v. 9, p. e01678-17, 2018. Doi: 10.1128/mBio.01678-17.
- ARMAND, B. et al. *Toxoplasma gondii* Type I, predominant genotype isolated from sheep in South of Iran. **Vet. World**, v. 10, n. 4, p. 386-392, 2017. Doi: 10.14202/vetworld.2017.
- AGHAEIPOUR, N. et al. An immune clock of human pregnancy. **Sci. Immunol.**, v. 2, n. 15, p. eaan2946, 2017. Doi: 10.1126/sciimmunol.aan2946.
- ABRAHAMS, V. M., et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. **J. Immunol. Methods.**, v. 173, n. 7, p. 4286-4296, 2004. Doi:10.4049/jimmunol.173.7.4286
- ASHOUR, et al. Toll-like receptor signaling in parasitic infections. **Expert. Rev. Clin. Immunol.**, v. 6, p. 771-780, 2015. Doi: 10.1586/1744666X.2015.1037286. Doi:10.1586/1744666X.2015.1037286
- BAINES, K.J.; RENAUD, S.J. Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 145, p. 39-88, 2017. Doi:10.1016/bs.pmbts.2016.12.003.
- BARBOSA B.F. et al. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin. Exp. Immunol.** v. 151, p. 536-545, 2008. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x.
- BARBOSA B.F., et al. IL10, TGF Beta1, and IFN Gamma Modulate Intracellular Signaling Pathways and Cytokine Production to Control *Toxoplasma gondii* Infection in BeWo Trophoblast Cells. **Biol. Reprod.** v. 92, p. 1-13, 2015. Doi: 10.1095/biolreprod.114.124115.
- BARBOZA, R. et al. Fetal-Derived MyD88 Signaling Contributes to Poor Pregnancy Outcomes During Gestational Malaria. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 68, 2019. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00068.

- BAUER, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 2, p. 812-822, 2004. Doi: 10.1210/jc.2003-031351.
- BEIJAR, E.C. et al. Expression and subcellular localization of TLR4 in term and first trimester human placenta. **Placenta**, v. 2, n. 3, p. 322-326, 2006. Doi: 10.1016/j.placenta.2004.12.012.
- BEHNKE, K., et al., The lymphotoxin beta receptor is essential for upregulation of IFN-induced guanylate-binding proteins and survival after *Toxoplasma gondii* Infection. **Mediators Inflamm.** v. 2017, p. 7375818, 2017. Doi: 10.1155/2017/7375818.
- BETANCOURT, E. D., et al., From entry to early dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter With Its Host. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.9, p. 46, 2019. Doi:10.3389/fcimb.2019.00046.
- BLADER, J.; SAEJI, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009. Doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x.
- BLADER, J., et al., The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 69, p. 463-485, 2015. Doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104100.
- BOTOS, I. et al., The structural biology of Toll-Like Receptors. **Structure**, v. 19, n.4, p. 447-459, 2011. Doi: 10.1016/j.str.2011.02.004.
- BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** , v. 72, p. 248-254, 1976. Doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J. Pathol.**, v. 2, p. 149-160, 2008. Doi: 10.1002/path.2287.
- CARELLOS, E. V. et al. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88588, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0088588.
- CASTILLO, C. et al. *Ex vivo* infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different *Toll-like receptor* expression and cytokine/chemokine profiles. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 78, n.1, p. e12660, 2017. Doi: 10.1111/aji.12660.

- CHANG, H.J., et al., Central nervous system toxoplasmosis in an immunocompetent individual. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v. 7, p.e12036, 2019. Doi: 10.2484/rcr.v9i1.908.
- CHÁVEZ, F. G. et al. Maternal immune response during pregnancy and vertical transmission in human Toxoplasmosis. **Front. Immunol.**, v. 10, p. 285, 2019. Doi: 10.3389/fimmu.2019.00285.
- CHEN, K. et al. Immune responses and protection after DNA vaccination against *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 2 (TgCDPK2). **Parasite**, v. 24, n.41, p. 41, 2017. Doi: 10.1051/parasite/2017045.
- CIERNA, Z. et al. Intermediate trophoblast--A distinctive, unique and often unrecognized population of trophoblastic cells. **Ann. Anat.**, v. 204, p. 45-50, 2015. Doi: 10.1016/j.aanat.2015.10.003.
- COWLEY, S.C. et al. Differential requirements by CD4+ and CD8+ T cells for soluble and membrane TNF in control of *Francisella tularensis* live vaccine strain intramacrophage growth. **J. Immunol.**, v.11, p. 7709-7719, 2007. Doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7709.
- DA SILVA, R. J. et al. Enrofloxacin and toltrazuril are able to reduce *Toxoplasma gondii* growth in human BeWo trophoblastic cells and villous explants from human third trimester pregnancy. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, p. 340, 2017. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00340.
- DAS, D. et al. Anti-viral role of toll like receptor 4 in hepatitis B virus infection: An in vitro study. **World J. Gastroenterol.**, v. 47, p. 10341- 10352, 2016. Doi: 10.3748/wjg.v22.i47.10341.
- DENNEY, C.F. et al. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.**, v. 4, p. 1547-1552, 1999.
- DONAHOE, S.L. et al. Differential gamma interferon- and tumor necrosis factor alpha-driven cytokine response distinguishes acute infection of a metatherian host with *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **Infect Immun.**, p. 6 pii: e00173-17, 2017. Doi: 10.1128/IAI.00173-17.
- DUBEY, J. P., et al., Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n.2, p. 267-299, 1998.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. **Boca Raton, FL: CRC Press**, 2010.
- DUBEY, J. P., et al., Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Vet. Parasitol.**, v. 188, n. 1-2, p. 14-18, 2012a. Doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.008.

- DUBEY, J. P., et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139,n.11, p. 1375-1424, 2012b. Doi: 10.1017/S0031182012000765.
- DUPONT, D. C., et al., Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin. Immunol.**, v. 34, n.6, p. 793-813, 2012. Doi: 10.1007/s00281-012-0339-3.
- EDEY, L. F. et al., Progesterone, the maternal immune system and the onset of parturition in the mouse. **Biol. Reprod.**, v. 98, n. 3, p. 376-395, 2018. Doi: 10.1093/biolre/iox146.
- EQUILS, O. et al. Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. **J. Immunol.**, v. 177, n. 2, p. 1257-63, 2006. Doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1257.
- FENOY, I.M. et al. *Toxoplasma gondii* infection induces suppression in a mouse model of allergic airway inflammation. **PLoS One.**, v. 8, p. e43420, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0043420.
- FOROUTAN-RAD, M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian pregnant women: A systematic review and meta-analysis. **Acta. Trop.**, v. 158, p. 160-9, 2016. Doi: 10.1016/j.actatropica.2016.03.003.
- FOULON, W. et al. Treatment of *toxoplasmosis* during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 180, n. 2, p. 410-415,1999. Doi: 10.1016/s0002-9378(99)70224-3.
- FURUTA, T. et al., Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. **Int. Immunol.**, v. 22, p. 1655-1662, 2006. Doi: 10.1093/intimm/dxl099.
- GANGNEUX, F. et al., Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012. Doi: 10.1128/CMR.05013-11.
- GAZZINELLI, R. T. et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 153, n. 6, p. 2533-43,1994.
- GENBACEV, O. et al. Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models--a review. **Placenta.**, v. 21, p. S45-S49, 2000. Doi: 10.1053/plac.1999.0523.
- GIERMAN, L. M. et al. *Toll-like receptor* profiling of seven trophoblast cell lines warrants caution for translation to primary trophoblasts. **Placenta**, v. 36, n. 11, p. 1246-53, 2015. Doi: 10.1016/j.placenta.2015.09.004.

- GONG H. et al., The regulation of ovary and conceptus on the uterine natural killer cells during early pregnancy. **Reprod. Biol. Endocrino.**v. 15, p. 15:73, 2017. Doi: 10.1186/s12958-017-0290-1.
- GOMES, A. O. et al. 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. Doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.005.
- GROEN, B. et al., Immunological adaptations to pregnancy in women with Type 1 diabetes. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 13618, 2015. Doi: 10.1038/srep13618.
- HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 10, p. 634-40, 2002. Doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x.
- HOLMLUND, U. et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 145-151, 2002. Doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01491.x.
- HOU, B. et al. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, n. 1, p. 278-283, 2011. Doi: 10.1073/pnas.1011549108.
- HUGHES, H.P.A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitol. Today.**, v. 4, p. 340–347, 1998.
- JEONG, Y.I. et al. Induction of IL-10-producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. **Biochem. Biophys. Rep.**, v. 7, p. 91-97, 2016. Doi: 10.1016/j.bbrep.2016.05.008.
- JIMENEZ-RUIZ, E. et al. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 209, n. 1-2, p. 18-25, 2016. Doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.01.007.
- KAGAN, J.C. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 361-368, 2008. Doi: 10.1038/ni1569.
- KAWASAKI, et al. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 461-468, 2014. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- KHAN, A. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 12, p. 5881-5887, 2005. Doi: 10.1128/JCM.43.12.5881-5887.2005.

KNÖFLER, M. et al. Interleukin-1 stimulates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release from cytotrophoblastic BeWo cells independently of induction of the TNF-alpha mRNA. **FEBS Lett.**, v. 2, p. 213-218, 1997. Doi: 10.1016/s0014-5793(97)00190-7.

KOGA, K. et al. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 35, n. 2, p. 191-202, 2009. Doi: 10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x.

KURMAN, R. J. et al. Discovery of a cell: reflections on the checkered history of intermediate trophoblast and update on its nature and pathologic manifestations. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 33, n. 4, p. 339-347, 2014. Doi: 10.1097/PGP.0000000000000144.

LEE et al. What is the trophoblast? A combination of criteria defines human trophoblasts in the first trimester. **Stem. Cell. Reports.** v.6, n. 2, p. 257-272, 2016. Doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.006

LEULIER, F., LEMAITRE, B. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. **Nat. Rev. Genet.**, v. 9, p. 165-178, 2008. Doi: 10.1038/nrg2303.

LI, X. et al. Toll-like receptor-4 signaling: a new potential therapeutic pathway for rheumatoid arthritis. **Rheumatol. Int.**, v. 11, p. 1613-1618, 2014. Doi: 10.1007/s00296-013-2890-1.

LIU et al., Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors.** p. 292-300, 2015. Doi: 10.1186/s13071-015-0902-6.

LUNGHI, L. et al., Control of human trophoblast function. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v. 5, 2007. Doi: 10.1186/1477-7827-5-6.

MELO, M. B. et al., *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends. Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011. Doi: 10.1016/j.pt.2011.08.001.

MINCHEVA, N. L. et al., Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 72, p. 440-457, 2014. Doi: 10.1111/aji.12311.

MIRANDA, V.D.S. et al. Toll-Like receptor 3-TRIF pathway activation by *Neospora caninum* RNA enhances infection control in mice. **Infect. Immuno.**, p. pii: e00739-18, 2019. Doi: 10.1128/IAI.00739-18.

- OLEIRO, A.F. et al. The critical analysis of available *in vitro* and *ex vivo* methods of retinal angiogenesis study. **J. Oftalmol.**, p. 3034953, 2017. Doi: 10.1155/2017/3034953.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. Doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X.
- MOUSAVI et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in acute and chronic phases of infection in immunocompromised patients and pregnant women with real-time PCR assay using TaqMan Fluorescent Probe. **Iran. J. Parasitol.** v. 3, p. 373-381, 2018.
- MURPHY, S.P. et al. Interferon gamma in successful pregnancies. **Biol. Reprod.**, v. 5, p. 848-859, 2009. Doi: 10.1095/biolreprod.108.073353.
- NAHOULI, H. et al. Soroprevalence of Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among lebanese pregnant women. **Vector. Borne. Zoonotic. Dis.**, v. 12, p. 785-790, 2017. Doi: 10.1089/vbz.2016.2092.
- NAKA, T. et al. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, v. 3, p. S233-42, 2002. Doi: doi.org/10.1186/ar565.
- NANOKA, S. et al. Characterization of Spz5 as a novel ligand for *Drosophila* Toll-1 receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 506, n. 3, p. 510-515, 2018. Doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.096
- NAPSO, T. et al. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. **Front. Physiol.**, v. 9, p. 1091, 2018. Doi: 10.3389/fphys.2018.01091.
- NATAMA, M. H. et al. Modulation of innate immune responses at birth by prenatal malaria exposure and association with malaria risk during the first year of life. **BMC Med**, p.198-214, 2018. Doi:10.1186/s12916-018-1187-3.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- OLAFSSON, E. B. et al., *Toxoplasma gondii* infection shifts dendritic cells into an amoeboid rapid migration mode encompassing podosome dissolution, secretion of TIMP-1 and reduced proteolysis of extracellular matrix. **Cell. Microbiol.**, v. 20, n. 3, p. e12808, 2018. Doi: 10.1111/cmi.12808.

- OSHIUMI, H. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 49751–49762, 2003. Doi: 10.1074/jbc.M305820200.
- PARKUNAN, S.M. et al. Unexpected roles for Toll-Like receptor 4 and TRIF in intraocular infection with gram-positive bacteria. **Infect. Immun.**, v.10, p. 3826-3936, 2015. Doi: 10.1128/IAI.00502-15.
- PATNI, S. et al. Expression and activity of Toll-Like Receptors 1–9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. **Oxford Academic.**, v.80, p.243-248, 2009. Doi: 10.1095/biolreprod.108.069252.
- PAUL et al., *Toxoplasma gondii* seroprevalence among pregnant women attending antenatal clinic in Northern Tanzania. **Trop. Med. Health.**, v. 46, p. PMC6245905, 2018. Doi: 10.1186/s41182-018-0122-9.
- PEREIRA, A.C.A. et al. Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitors Reduce *Toxoplasma gondii* Infection and Upregulate the Pro-inflammatory Immune Response in *Calomys callosus* Rodents and Human Monocyte Cell Line. **Front. Microbiol.**, v.10, p. 225, 2019. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00225.
- PETERSEN, E. et al. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 2, p. 115-144, 2001. Doi: 10.1016/S0020-7519(00)00140-5.
- PIJNENBORG, R. et al. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. **Placenta**, v. 2, p. 71-91, 1981. Doi: 10.1016/S0143-4004(81)80042-2.
- PIJNENBORG R. et al. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. **Placenta**. v. 27, p. 939-958, 2006. Doi: 10.1016/j.placenta.2005.12.006.
- PUDNEY, J. et al. Differential expression of Toll-like receptors in the human placenta across early gestation. **Placenta**, v.46, p. 1-10,2016. Doi: 10.1016/j.placenta.2016.07.005.
- RAJAPAKSE, S. et al. Prophylaxis of human toxoplasmosis: a systematic review. **Pathog. Glob. Health.**, v. 111, n. 7, p. 333-342, 2017. Doi: 10.1080/20477724.2017.1370528.
- REGO, W. M. F. et al. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 247, p. 19-25, 2017. Doi: 10.1016/j.vetpar.2017.09.015.

- REGO et al., Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates obtained from free-living wild birds rescued in Southeastern Brazil. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 7, n. 3, p., 432-438, 2018. Doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.11.001.
- ROBINSON, D. P.; KLEIN, S.L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. **Horm Behav**, v. 62, n. 3, p. 263-271, 2012. Doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.023.
- RORMAN, E. et al. Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod. Toxicol.**, v. 21, n. 4, p. 458-72, 2006. Doi: 10.1016/j.reprotox.2005.10.006
- ROSÁRIO, G.X. et al., Intrauterine fate of invasive trophoblast cells. **Placenta**. v. 30, n.5, p. 457-463, 2009. Doi: 10.1016/j.placenta.2009.02.008.
- SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **J. Reprod. Immunol.**, v. 2, p. 87-103, 2000. Doi: 10.1016/S0165-0378(00)00060-7
- SARDINHA-SILVA, A. et al. *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 bind to Toll-like receptors 2 and 4 N-glycans triggering innate immune response. **bioRxiv**, p. 187690, 2017. Doi: 10.1371/journal.ppat.1007871.
- SCHATZ, F. et al. Toll-like receptor 4 expression in decidual cells and interstitial trophoblasts across human pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 68, n. 2, p. 146-153, 2012. Doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01148.x.
- SCHWARTZMAN, J. et al. Congenital Toxoplasmosis. **J. Pediatr.**, v. 33, p. 66-73, 1948. Doi: 10.1016/S0022-3476(48)80154-X.
- SHALABY, K.H. A. et al. The TLR4-TRIF pathway can protect against the development of experimental allergic asthma. **Immunology.**, v. 152, n. 1, p.138-149, 2017. Doi: 10.1111/imm.12755.
- SHER, A. et al., Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 14, n. 1, p. 36-42, 2017. Doi: 10.1038/cmi.2016.12.
- TESHINYA, K. et al. The TLR4-TRIF pathway protects against H5N1 influenza virus infection. **J. Virol.** V. 86, n. 1, p. 19-24, 2012. Doi: 10.1128/JVI.06168-11.

- SHWAB, E. K. et al., Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014. Doi: 10.1017/S0031182013001844.
- SHWAB, E. K. et al. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 46, n. 2, p. 141-146, 2016. Doi: 10.1016/j.ijpara.2015.10.005.
- SIWETZ, M. et al. TNF- α alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta. **Lab. Invest.**, v. 4, p. 428-438, 2016. Doi: 10.1038/labinvest.2015.159.
- SOLDATI-FAVRE, D. Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 197-205, 2008. Doi: 10.1051/parasite/2008153197.
- SOUZA, W. et al. Structural organization of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite. **Sci. Med.**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- SUN, L. et al. Association between higher expression of interleukin-8 (IL-8) and haplotype -353A/-251A/+678T of IL-8 gene with preeclampsia: A case-control study. **Medicine.**, v. 52, p. e5537, 2016. Doi: 10.1097/MD.0000000000005537
- SUZUKI, Y. et al. Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 13, p. e31, 2011. Doi: 10.1017/S1462399411002018.
- TANGERÅS, L.H. et al. Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. **J. Reprod. Immunol.**, v. 106, p. 89-99, 2014. Doi: 10.1016/j.jri.2014.04.004.
- TANETTA D. et al. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles – Circulating biopsies reflecting placental health. **Placenta**, v.52, p. 134-138, 2017. Doi: 10.1016/j.placenta.2016.11.008.
- TARRADE A. et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. **Lb. Invest.** v. 81, p. 1199-1211, 2001.
- TAVAKKOL, A.Z. et al. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1- β Polymorphisms in Pre-Eclampsia. **Iran. J. Immunol.**, v. 4, p. 309-316, 2016. Doi: IJIV13i4A7.
- TENTER, A. M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000. Doi: 10.1016/S0020-7519(00)00124-7.

- UMEDA, K. et al. Transcriptional profiling of Toll-like receptor 2-deficient primary murine brain cells during *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS ONE** v. 12, n. 11, p. e0187703, 2017. Doi: 10.1371/journal.pone.0187703.
- VELICKY P. et al. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. **Cell. Adh. Migr.** v. 10, p.154-162, 2016. Doi: 10.1080/19336918.2015.1089376.
- WANG, Y. et al. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. **J. Reprod. Immunol.**, v. 2, p. 157-169, 1996. Doi: 10.1016/S0165-0378(96)00998-9.
- WITTEBOLE, X. et al. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. **Mediators. Inflamm.**, p.568396, 2010. Doi: 10.1155/2010/568396.
- WU, K. et al. TLR4/MyD88 signaling determines the metastatic potential of breast cancer cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 3, p.3411-3420, 2018. Doi: 10.3892/mmr.2018.9326.
- WUJCICKA, W. et al. SNPs in toll-like receptor (TLR) genes as new genetic alterations associated with congenital toxoplasmosis? **Eur. J. Clin .Microbiol. Infect. Dis.** P. 503-511, 2013. Doi: 10.1007/s10096-012-1763-y.
- WUJCICKA, W. et al. Do the placental barrier, parasite genotype and Toll-like receptor polymorphisms contribute to the course of primary infection with various *Toxoplasma gondii* genotypes in pregnant women? **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, n. 5, p. 703-709, 2014. Doi: 10.1007/s10096-013-2017-3.
- WUJCICKA, W. et al. Genetic modifications of cytokine genes and *Toxoplasma gondii* infections in pregnant women. **Microb. Pathog.**, v.121, p.283-292, 2018. Doi: doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.048
- YAN, C. et al. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 137, 2016. Doi: 10.1186/s13071-016-1432-6.
- YUI, J. et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. **Placenta.**, v.15, p.819-835, 1994. Doi: 10.1016/S0143-4004(05)80184-5
- ZARE-BIDAKI, M. et al. TGF- β in Toxoplasmosis: Friend or foe? **Cytokine.**, v. 86, p. 29-35, 2016. Doi: 10.1016/j.cyto.2016.07.002.

ZHANG, K. et al. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. **Clin. Chim. Acta** v. 461, p.83-89, 2015. Doi: 10.1016/j.cca.2016.07.018.

ZHANG, Z. et al. Toward a structural understanding of nucleic acid-sensing Toll-like receptors in the innate immune system. **FEBS Lett.**, v. 591, n.20, p. 3167-3181, 2017. Doi: 10.1002/1873-3468.12749.

ZORGI, N. E. et al. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. **Immunol Lett**, v. 138, n. 2, p. 187-196, 2011. Doi: 10.1016/j.imlet.2011.04.007.