

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Mecanismos de transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii* em modelos murinos e em cultura de células

RAFAELA JOSÉ DA SILVA

UBERLÂNDIA
Janeiro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Mecanismos de transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii* em modelos murinos e em cultura de células

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

RAFAELA JOSÉ DA SILVA

Orientadora: Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Coorientador: Dr. Jon Patrick Boyle

UBERLÂNDIA

Janeiro – 2021

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

S586 2021	<p>Silva, Rafaela José da, 1991- Mecanismos de transmissão transplacentária de Toxoplasma gondii em modelos murinos e em cultura de células [recurso eletrônico] / Rafaela José da Silva. - 2021.</p> <p>Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa. Coorientador: Jon Patrick Boyle. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.213 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-, (Orient.). II. Boyle, Jon Patrick, 1972-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 138 do PPIPA				
Data:	dezoito de fevereiro de dois mil e vinte um	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	19h43min
Matrícula do Discente:	11623IPA005				
Nome do Discente:	Rafaela José da Silva				
Título do Trabalho:	Mecanismos de transmissão transplacentária de <i>Toxoplasma gondii</i> em modelos murinos e em cultura de células				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização do comportamento das células trofoblásticas frente a transmissão congênita do toxoplasma gondii				

Reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes - UFTM; Profa. Dra. Mariana Bodini Angeloni - UFG, Profa. Dra. Letícia Castro Filice - FAMED/UFU; Dra. Priscila Silva Franco - UFU, Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - ICBIM-UFU (Presidente) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, apresentou a Comissão Examinadora e o candidata agradeceu a presença do público, e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Letícia de Souza Castro Filice, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/02/2021, às 19:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/02/2021, às 19:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Bodini Angeloni, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Silva Franco, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2569711** e o código CRC **A7AD034E**.

Dedicatória

Neste momento, mais uma etapa de minha vida está sendo cumprida, e dedico este trabalho à minha querida mãe Ivone (in memoriam). Sou muito grata por ter tido você como minha mãe, não podia ter sido mais abençoada. Esta tese representa uma grande vitória e a certeza de que todo o seu esforço valeu a pena, pois você fez o melhor e tudo que esteve ao seu alcance para que eu e minha irmã pudéssemos ter a melhor educação! Eu sei que se estivesse aqui estaria com a certeza de missão cumprida. Eu sempre honrarei todo seu esforço e dedicação!!! Muito obrigada por todo amor!! Te amo muito e para sempre!!

Agradecimento Especial

Agradeço de todo meu coração a minha orientadora Dra. Bellisa de Freitas Barbosa.

Primeiramente, muito obrigada por me aceitar como sua aluna desde o início da graduação. Agradeço pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste trabalho, pela sua paciência, por todo carinho e atenção durante todos esses anos.

Agradeço a disponibilidade em me ajudar em todos os momentos, seja dentro do laboratório ou mesmo fora do nosso ambiente de trabalho. Tenho a certeza que além de uma grande orientadora eu tenho uma grande amiga. Tenho muito carinho e admiração pela sua pessoa e pela sua competência em tudo que faz.

Agradecimento Fundamental

Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança depositada desde a iniciação científica. Sou muito grata por todo o carinho que sempre teve comigo e a atenção nos momentos mais difíceis da minha vida. Gratidão por todos os ensinamentos que levarei para o resto da vida!

Prof. Dr. Jon Patrick Boyle

Sou muito grata pela oportunidade de ter realizado o doutorado sanduíche em seu laboratório! Agradeço por você ter disponibilizado o seu tempo e todos os recursos para me ensinar tantas técnicas inovadoras, as quais foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho!

Prof. Dr. José Roberto Mineo

Muito obrigada pelo apoio durante todos esses anos na pós-graduação. Sou muito grata pela ajuda que recebi para realizar o meu doutorado sanduíche!

Profa. Dra. Neide Maria da Silva

Agradeço muito pelo auxílio para obtenção dos animais ICAM-1^{-/-}! A parceria com o seu laboratório foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe Ivone (in memoriam) e ao meu pai Alcides por serem a minha base, por toda dedicação e por não medirem esforços para dar a mim e à minha irmã a melhor educação. Agradeço por todos os ensinamentos, por sempre apoiarem as minhas decisões e permitirem que eu vivesse tantas experiências, que foram importantes para o meu crescimento, tanto pessoal, quanto profissional. Muito obrigada por todo o amor!! Amo vocês!

À minha irmã Carollina por todo seu carinho! Agradeço por ter você comigo nessa vida, me apoiando e me ajudando em todos os momentos! Nesses últimos anos você foi muito importante por não me deixar desistir dos meus sonhos! Te amo!

Agradeço imensamente ao meu namorado Guilherme, pela sua companhia todos estes anos. Você é uma pessoa maravilhosa e, sem dúvidas, foi essencial para a realização desta conquista, pois sempre estive ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada pelo carinho, paciência, amizade, compreensão e pelo seu amor! Também não poderia deixar de agradecer pela oportunidade de conviver com sua família!! Tenho meus sogros Suzan e José Feitoza, e meu cunhado João Victor como uma segunda família para mim.

Aos meus tios Lília, Mara e Osvaldo por estarem sempre presentes na minha vida, me apoiando em todos os momentos! Agradeço por todo amor e carinho!! Vocês são muito queridos e especiais para mim!

Às minhas amigas: Andressa, Angélica, Fernanda, Idessândia, Iliana, Letícia, Mariana, Mayara, Pâmela e Priscila. Agradeço todos os dias por ter vocês como amigas. Vocês são pessoas incríveis!! Muito obrigada por todos os momentos de descontração, seja dentro ou fora do laboratório, pelas palavras de carinho, pelos conselhos, e por todo apoio nos momentos em que eu mais precisei!!

Aos meus colegas de laboratório: Alessandra, Guilherme, Maria Thereza, Luana Thádia e Samuel. Obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar e por todos os momentos de descontração!

Aos meus amigos Ana Letícia, Isabela, Melina e Eduardo. Muito obrigada pela amizade desde nossos tempos da graduação!! Vocês são muito queridos e tenho muito orgulho da amizade que construímos! Sei que posso contar sempre com vocês.

Aos amigos que conheci durante o intercâmbio nos Estados Unidos: Maiwase, Jing, Nicolas e Sheen! Sou grata por todos os momentos que vivemos juntos, seja dentro ou fora do ambiente de trabalho! Agradeço em especial à Sheen pela disponibilidade e paciência para me ensinar as técnicas moleculares.

Aos alunos da professora Neide: Marcos Paulo e Yusmares, pela disponibilidade para me ajudar

Aos técnicos da Histologia: Estér e Fabrício pelo apoio e disponibilidade.

Às secretárias da Pós-Graduação: Lucélia, Lucileide e Cláudia pelo apoio e dedicação para resolver as questões burocráticas.

À FAPEMIG, CAPES e ao CNPq pelo financiamento de projetos, e em especial à FAPEMIG e CAPES pela concessão de bolsa.

*Da minha aldeia vejo quanto da terra se pode ver do Universo...
Por isso a minha aldeia é tão grande como outra terra qualquer,
Porque eu sou do tamanho do que vejo
E não do tamanho da minha altura...*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e características gerais	15
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> : formas de infecção e ciclo de vida	18
1.3. Toxoplasmose	23
1.4. Toxoplasmose congênita.....	24
1.5. Resposta imune a <i>T. gondii</i> e mecanismos de evasão.....	26
1.6. Migração de <i>T. gondii</i>	32
CAPÍTULO I	34
1. INTRODUÇÃO	35
1.1. ICAM-1 e a adesão de <i>T. gondii</i> no trofoblasto.....	35
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1. Animais de experimentação	41
4.2. Manutenção da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	41
4.3. Grupos experimentais	41
4.4. Extração de DNA	43
4.5. Reação de PCR em tempo real para quantificação parasitária	44
4.6. Detecção de citocinas (CBA).....	44
4.7. Análise estatística.....	44
4.8. Normas de biossegurança	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Camundongos ICAM-1 ^{-/-} e WT apresentaram variações nas taxas de reabsorção e números de sítios de implantação dependendo do tempo de infecção e gestação ...	46
5.2. Fêmeas ICAM-1 ^{-/-} (8dg/8di) apresentaram maior taxa de infecção por <i>T. gondii</i> no corno uterino gravídico.....	48
5.3. Fêmeas ICAM-1 ^{-/-} (14dg/7di) apresentaram maior taxa de infecção por <i>T. gondii</i> na placenta.....	48
5.4. IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 são modulados pela infecção por <i>T. gondii</i> dependendo do tempo gestacional.....	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	56
FIGURAS	57

TABELAS	72
CAPÍTULO II.....	77
1. INTRODUÇÃO	78
1.1. Placenta: estrutura e mecanismos de defesa aos patógenos	78
1.2. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para estudo da transmissão congênita de <i>T. gondii</i>	80
2. JUSTIFICATIVA	83
3.1. Objetivo geral.....	84
3.2. Objetivos específicos.....	84
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
4.1. Cultura de células trofoblásticas mesenquimais humanas (TS ^{CT})	85
4.2. Diferenciação de células citotrofoblasto (TS ^{CYT}) em sinciotrofoblasto (TS ^{SYN}) e infecção com <i>T. gondii</i>	85
4.3. Cultura de parasitos	86
4.4. Imunofluorescência	86
4.5. RT-qPCR.....	88
4.6. Sequenciamento de RNA e análises utilizando DESeq2 e Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA)	89
4.7. ELISA	89
4.8. Análise Estatística.....	90
5. RESULTADOS	91
5.1. Células sinciotrofoblastos (3D) foram eficientemente diferenciadas a partir de células citotrofoblastos	91
5.2. Células TS ^{SYN} são mais resistentes à infecção por <i>T. gondii</i> do que as células TS ^{CYT}	91
5.3. <i>T. gondii</i> não é capaz de crescer em TS ^{SYNs} ao longo do tempo	92
5.4. Processo de invasão é o primeiro mecanismo de resistência de SYN contra <i>T. gondii</i>	92
5.5. CYT e SYN derivados de células TS ^{CT} não produzem CCL22	93
5.6. Células TS ^{SYN} e TS ^{CYT} infectadas com <i>T. gondii</i> apresentam uma grande diferença na expressão gênica	93
5.7. Vias relacionadas ao metabolismo como glicólise, fosforilação oxidativa e adipogênese foram moduladas negativamente nas células TS ^{SYN}	95
6. DISCUSSÃO	97
7. CONCLUSÕES	104
FIGURAS	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ANEXO I.....	151

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de células. Este parasito apresenta uma grande habilidade de explorar diversas moléculas presentes na superfície das células e ultrapassar diferentes barreiras biológicas, e finalmente alcançar os tecidos considerados imunologicamente privilegiados, como a placenta. Embora esse órgão represente uma formidável barreira contra a infecção por *T. gondii*, a transmissão deste para o feto pode ocorrer em alguns casos. Entretanto, os mecanismos envolvidos na transmissão do parasito pela placenta ainda são mal compreendidos. Assim, o presente trabalho teve dois objetivos gerais: (i) avaliar o papel de ICAM-1 na passagem transplacentária de *T. gondii* em modelos animais murinos C57BL/6 WT e ICAM-1 *knockouts* (ICAM-1^{-/-}); e (ii) caracterizar células trofoblásticas mesenquimais humanas (TS^{CT}) para avaliar se elas recapitulam a sensibilidade de células trofoblásticas primárias humanas frente a infecção por *T. gondii*, bem como avaliar a expressão diferencial de genes entre células citotrofoblásticas (TS^{CYT}) e sinciciotrofoblásticas (TS^{SYN}) após a infecção. Para responder ao primeiro objetivo, fêmeas WT e ICAM-1^{-/-} foram acasaladas e após a detecção do início da gestação, os animais foram infectados com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e divididos em diferentes grupos de acordo com o dia de infecção e eutanásia (8dg/8di, 14dg/7di, 19dg/12di e 19dg/8di). Fêmeas prenhes não infectadas foram usadas como controles (8dg/ni, 14dg/ni, 19dg/ni). Em todos os animais foram avaliados o número de sítios de implantação, e de reabsorção. Além do mais, foi coletado o soro para análise de citocinas por CBA; os órgãos maternos, incluindo cornos uterinos, e embriões/fetos e placentas foram coletados para avaliação do parasitismo por qPCR. Os resultados mostraram que fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas no início da gestação (8dg/8di) e no final do terço médio de gestação (19dg/8di) tiveram maior comprometimento do sucesso gestacional se comparado às fêmeas WT. Em relação ao parasitismo, fêmeas ICAM-1^{-/-} 8dg/8di e 14dg/7di apresentaram maior taxa de infecção por *T. gondii* no corno uterino gravídico e na placenta, respectivamente, ao comparar com fêmeas WT. Por outro lado, não foram verificadas diferenças significativas na carga parasitária no baço e fígado entre as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT nos grupos 8dg/8di e entre os tecidos fetais dos animais ICAM-1^{-/-} e WT nos grupos 14dg/7di. Adicionalmente, a dosagem de citocinas mostrou que IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram moduladas pela infecção dependendo do tempo gestacional. Para a realização do segundo capítulo, células TS^{CYT} foram cultivadas em

cultura e diferenciadas em TS^{SYN} e infectadas ou *mock* infectadas (apenas meio) com *T. gondii*. Em seguida, foi avaliada a porcentagem de diferenciação em células TS^{SYN}, bem como a taxa de infecção entre as células TS^{CYT} e TS^{SYN} por meio ensaio de RT-qPCR. O sobrenadante foi coletado para dosagem da quimiocina CCL22. Em seguida, células infectadas e *mock* infectadas foram coletadas e submetidas à análise pelo sequenciamento de RNA. Os dados mostraram que TS^{SYN} foram altamente refratárias à adesão e replicação de *T. gondii* quando comparado com as células TS^{CYT}. Além do mais, os resultados mostraram que ambas as células não foram capazes de produzir CCL22 em resposta à infecção pelo parasito. Também, os dados de RNA-seq mostraram diferenças no transcriptoma entre TS^{SYN} e TS^{CYT} após a infecção com *T. gondii*, evidenciando que vias relacionadas ao metabolismo e ao ciclo celular foram reguladas negativamente em células TS^{SYN} em comparação com TS^{CYT}. Finalmente, o perfil transcricional de *T. gondii* identificou diferenças significativas na expressão de genes em parasitos que infectaram/ou estavam associados às células TS^{SYN} em relação às células TS^{CYT}, evidenciando alterações nos genes envolvidos na replicação do DNA e no metabolismo, principalmente nas vias relacionadas com a síntese de ácidos graxos. Em conjunto, nossos dados indicaram que células TS^{CT} representam um promissor modelo no estudo das interações *T. gondii*/placenta, além disso, os resultados sugerem que a resistência das células TS^{SYN} pode estar associada ao baixo metabolismo celular e baixa produção de nutrientes por tais células, conferindo um ambiente estressante para o desenvolvimento do parasito.

Palavras chave: ICAM-1, *Toxoplasma gondii*, transmissão transplacentária, células trofoblásticas mesenquimais humanas e C57BL/6.

Abstract

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan parasite that is able to infect a wide variety of cells. This parasite has a great ability to explore various molecules present on the surface of cells and overcome different biological barriers, and finally reach the tissues considered immunologically privileged, such as placenta. Although this organ represents a formidable barrier against a *T. gondii* infection, its transmission to the fetus can occur. However, the mechanisms involved in the transmission of the parasite through the placenta are still poorly understood. Therefore, the present work had two major goals: (i) evaluate the role of ICAM-1 in the transplacental passage of *T. gondii* in murine animal models C57BL/6 WT and ICAM-1 knockouts (ICAM-1^{-/-}); and (ii) characterize human mesenchymal trophoblastic cells (TS^{CT}) to assess whether they recapitulate the sensitivity of primary human trophoblastic cells by *T. gondii* infection, as well as to evaluate the differential gene expression between cytotrophoblastic (TS^{CYT}) and syncytiotrophoblastic cells (TS^{SYN}) after the infection. To answer the first objective, WT and ICAM-1^{-/-} mice were mated and after detecting the first day of pregnancy, the animals were infected with 5 cysts of ME-49 strain of *T. gondii* and divided in different groups according to the day of infection and euthanasia (8dg / 8di, 14dg / 7di, 19dg / 12di and 19dg / 8di). Uninfected pregnant females were used as controls (8dg/ni, 14dg/ni, 19dg/ni). The number of implantation and resorption sites was evaluated. In addition, serum was collected for cytokine analysis; maternal organs, including uterine horns, and embryos/fetus and placentas were collected to assess the parasitism by qPCR. The results showed that ICAM-1^{-/-} females infected at the beginning of pregnancy (8dg/8di) and at the end of the middle third of pregnancy (19dg/8di) had a greater impairment of gestational success compared to the WT females. Regarding to the parasitism, ICAM-1^{-/-} 8dg/8di and 14dg/7di presented higher rates of infection in uterine horns and in the placenta, respectively, compared to WT. On the other hand, no significant differences were seen in the parasitism in the spleen and liver between ICAM-1^{-/-} and WT in the 8dg/8di groups, and between fetal tissues of ICAM-1^{-/-} and WT animals in the group 14dg/7di. Additionally, the cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-10 were modulated by infection depending on the gestational time. For the second chapter, TS^{CYT} cells were cultured and differentiated into TS^{SYN} and infected or mock infected (only medium) with *T. gondii*. Then, the percentage of differentiation in TS^{SYN} cells was evaluated, as well as the infection rate between TS^{CYT} and TS^{SYN} cells through the RT-qPCR assay. The

supernatant from the different experimental conditions was collected to measure the chemokine CCL22. Then, infected and mock infected cells were collected and subjected to analysis by RNA sequencing. The data showed that TS^{SYN} were highly refractory to the adhesion and replication of *T. gondii* when compared with TS^{CYT} cells. Furthermore, the results suggested that both cells are not able to produce CCL22 in response to the parasite infection. Evaluating the RNA-seq data, we observe a huge difference in the transcriptome between TS^{SYN} and TS^{CYT} after the infection by *T. gondii*, showing that pathways related to metabolism and the cell cycle are negatively regulated in TS^{SYN} cells compared to TS^{CYT}. Finally, the transcriptional profile of *T. gondii* identified differences in gene expression in the parasites that infected/or were associated with TS^{SYN} cells in relation to TS^{CYT} cells, showing differences in genes involved in DNA replication and metabolism pathways, especially those related to the biosynthesis of fatty acids. Together, our data indicate that TS^{CT} cells represent a promising model in the study of *T. gondii*/placenta interactions; moreover, we suggest that the resistance of TS^{SYN} cells may be associated with low cell metabolism and low nutrient production by such cells, providing a stressful environment for the development of the parasite.

Keywords: ICAM-1, *Toxoplasma gondii*, transplacental transmission, human trophoblast stem cells and C57BL/6.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Toxoplasma gondii* e características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório responsável pela toxoplasmose (BUXTON et al., 2007; SMITH et al., 2020). Pertence ao filo Apicomplexa à classe Sporozoa, à subclasse Coccidia, à Ordem Eucoccidida e à Família Sarcocystidae (SMITH et al., 2020). *T. gondii* é a única espécie do gênero *Toxoplasma*, mas está intimamente relacionado com *Hammondia hammondi* e *Neospora caninum*, com os quais compartilha características morfológicas, moleculares e do ciclo de vida (SOKOL-BORRELLI; COOMBS; BOYLE, 2020).

Este protozoário foi descrito simultaneamente no ano de 1908 na Tunísia por Nicolle e Manceaux, os quais descreveram *T. gondii* em um roedor (*Ctenodactylus gundi*), e no Brasil, por Splendore, que relatou a presença do parasito em uma espécie de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) (DUBEY et al., 2008). A infecção por *T. gondii* pode ocorrer em uma vasta gama de animais vertebrados, como aves e mamíferos, incluindo os seres humanos. Estima-se que um terço da população humana é acometida por esta infecção, e por esta razão, este é considerado um dos parasitos mais bem adaptados capaz de infectar os seres humanos (KUL et al., 2013; PINTO-FERREIRA et al., 2019). A prevalência da infecção varia entre diferentes países, dentro de um mesmo país e também no interior de uma mesma região. E vários fatores são responsáveis por essas variações de prevalência, como hábitos alimentares e culturais, condições socioeconômicas e qualidade do saneamento básico (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009; ROBERT-GANGNEUX, 2014; FOROUTAN-RAD et al., 2016; TEWELDEMEDHIN et al., 2019).

Toxoplasma gondii é um parasito unicelular eucarionte e se assemelha às demais células eucariontes, possuindo núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias (ATTIAS et al., 2020). Além de organelas típicas de organismos eucariontes, o protozoário apresenta organelas secretórias apicais, localizadas na porção apical, chamadas de micronemas e roptrias, envolvidas nos processos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira. Um terceiro tipo de organela secretória, os grânulos densos que são distribuídos ao longo da estrutura do parasito (BLADER; SAEIJ, 2009; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016; ATTIAS et al., 2020).

As micronemas são organelas secretórias apicais mais abundantes e contêm uma grande quantidade de proteínas que são responsáveis por várias funções biológicas como adesão, motilidade e invasão na célula hospedeira, secreção de roptrias e evasão do vacúolo parasitóforo (DUBOIS; SOLDATI-FAVRE, 2019). Durante o processo de

adesão, motilidade do parasito e a invasão na célula hospedeira, é gerada uma cascata de sinais que desencadeia a secreção de adesinas, também conhecidas como micronemas (MICs), resultando no desenvolvimento de proteínas micronemais transmembrânicas na superfície do parasito, onde irá formar sítios de ligação com as células hospedeiras (SOLDATI-FAVRE, 2008; SOUZA et al., 2010; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016; ATTIAS et al., 2020). Adicionalmente, durante a exocitose, as micronemas liberam outras proteínas, como complexos de adesinas e perforinas que auxiliam a saída do parasito das células infectadas (SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001).

São descritas muito tipos de proteínas pelas micronemas (BLADER; SAEIJ, 2009), sendo a proteína de micronema tipo 2 (MIC2) a mais bem caracterizada. Tal proteína é expressa em todos os estágios invasivos do parasito e consegue se ligar às moléculas de adesão do hospedeiro, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), permitindo ao parasito migrar até os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta (BARRAGAN; HITZIGER, 2008; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESA et al., 2011). Um estudo mostrou que a deleção de MIC2 comprometeu a fixação do parasito e conseqüentemente reduziu a motilidade e a invasão da célula hospedeira em modelos *in vitro* (GRAS et al., 2017). MIC1 foi descrito por reconhecer os glicanos da célula hospedeira via domínio de repetição adesinas de micronemas (MAR), os quais se ligam em domínios de micronemas tipo 3 (MIC3), facilitando a adesão na célula hospedeira (CÉRÈDE et al., 2005; HARKER; UENO; LODOEN, 2015). Durante a divisão celular e formação de novas células filhas, as micronemas são formadas através da síntese *de novo* e através da reciclagem das proteínas de micronemas secretadas pela célula mãe em uma rota endocítica (JIMENEZ-RUIZ et al., 2016; PERIZ et al., 2019). Os mecanismos envolvidos na reciclagem de proteínas de micronemas são dependentes de uma rede de F-actina altamente dinâmica, porém a síntese *de novo* parece ser independente de F-actina (PERIZ et al., 2019).

Roptrias estão associadas à invasão do parasito na célula hospedeira e à formação do vacúolo parasitóforo (SOUZA et al., 2010). A liberação de proteínas derivadas de roptrias (ROPs), ROP2, ROP4, ROP5 e ROP8 associam-se para formar um complexo capaz de transportar o parasito para o interior da célula hospedeira (SOUZA et al., 2010). As proteínas de roptrias podem ser direcionadas para o espaço do vacúolo parasitóforo que está em desenvolvimento, para a membrana do vacúolo parasitóforo, para o citoplasma ou núcleo da célula hospedeira (VENUGOPAL; MARION, 2018). As proteínas da família ROP2 são um exemplo de ROPs direcionadas à membrana do

vacúolo parasitóforo, envolvidas na proteção do parasito contra a degradação pelo hospedeiro (VENUGOPAL; MARION, 2018). A pseudoquinase ROP5 ativa a quinase ROP18, que fosforila GTPases imuno-relacionadas (IRGs) do hospedeiro, impedindo assim a lise dessa estrutura e eliminação do parasito por macrófagos (FLECKENSTEIN et al., 2012). ROP18 e ROP5 são determinantes na virulência em camundongos entre as cepas do parasito (SAEIJ et al., 2006; SHWAB et al., 2014). ROP17 foi descrito por interagir com ROP5 e juntos desempenham o papel na evasão do sistema imune (SHWAB et al., 2016). ROP16 e PP2C-hn (proteína fosfatase da família 2C) são exemplos de ROPs que alçam o núcleo da célula hospedeira (GILBERT et al., 2007). ROP16 demonstrou interagir com a via de sinalização do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) do hospedeiro, afetando a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (GILBERT et al., 2007; SAEIJ et al., 2007).

De maneira geral, as proteínas ROP são fatores essenciais secretados que modulam as respostas do hospedeiro de uma maneira dependente da cepa para garantir a sobrevivência, disseminação, persistência e propagação do parasita para novos hospedeiros (VENUGOPAL; MARION, 2018).

Similar às proteínas ROP, as proteínas de grânulos densos (GRA) descarregam seu conteúdo proteico em diferentes alvos, como no interior do vacúolo parasitóforo, na membrana do vacúolo parasitóforo, no citoplasma ou no núcleo das células hospedeiras (VENUGOPAL; MARION, 2018). GRA1 é um exemplo de proteínas de grânulo denso secretadas para o vacúolo parasitóforo, GRA18 tem como destino o citosol, GRA16, o núcleo, e GRA7 a membrana do vacúolo parasitóforo (RASTOGI; CYGAN; BOOTHROYD, 2019).

A secreção de GRAs por *T. gondii* na célula hospedeira começa antes da invasão do parasito. Uma vez completado o processo de invasão, GRAs continuam sendo secretadas para modificar o vacúolo parasitóforo e criar um microambiente favorável para a replicação do parasito dentro da célula hospedeira (RASTOGI; CYGAN; BOOTHROYD, 2019). Além do mais, GRAs estão diretamente associadas à alteração de transcrição de genes na célula hospedeira. GRA15 é descrito por ativar a via do NFκ-B em parasitos da cepa II (ROSOWSKI et al., 2011). GRA24 medeia a ativação da via p38α MAP quinase que modula a resposta imune da célula hospedeira (BRAUN et al., 2013). GRA 11 está envolvida na formação de parte da parede do cisto que circunda os bradizoítas (FOX et al., 2011). Assim, coletivamente, as organelas de secreção contribuem para a invasão e a permanência do parasito nas células hospedeiras.

Além das organelas secretórias, o parasito também possui o apicoplasto. Acredita-se que esta estrutura seja de origem endossimbiótica, pois é uma organela semelhante a um plastídeo, derivado de algas vermelhas através de uma segunda endossimbiose (MARTINS-DUARTE et al., 2015; ATTIAS et al., 2020). Embora a função fotossintética tenha sido perdida durante a evolução, esta organela ainda apresenta vias metabólicas de origem procarionte, das quais são essenciais para a sobrevivência do parasito, como a presença de um DNA cromossomal extra e produção de ácidos graxos pela via da síntese *de novo* (FAS II), além de várias proteínas (MARTINS-DUARTE et al., 2015; ARISUE; HASHIMOTO, 2015; ATTIAS et al., 2020).

T. gondii ainda apresenta um complexo de membrana interna (IMC) que representa uma importante organela envolvida na motilidade e replicação do parasito. IMC está localizado abaixo da membrana plasmática do parasito e é composta por sacos achatados de membrana, presos a face citoplasmática por proteínas semelhantes a filamentos intermediários altamente organizadas e por interações com microtúbulos (HARDING; MEISSNER, 2014; CHOI et al., 2019). Durante a divisão dos taquizoítas por endodiogenia, este complexo faz-se extremamente importante, uma vez que proteínas presentes neste compartimento regulam a formação de duas novas células dentro da célula mãe (FUNG et al., 2012; HARDING; MEISSNER, 2014). Outro importante papel do complexo de membrana interna é atuar como ancoragem para o complexo motor da actina e miosina durante a motilidade e invasão na célula hospedeira (OPITZ; SOLDATI, 2002; BARGIERI et al., 2013; HARDING; MEISSNER, 2014).

1.2. *Toxoplasma gondii*: formas de infecção e ciclo de vida

Toxoplasma gondii possui três estágios infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas são encontrados na fase aguda da infecção, caracterizando-se por apresentar alta capacidade de multiplicação e disseminação em vários tecidos, como os tecidos muscular, ocular, nervoso e placenta de hospedeiros (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ATTIAS et al., 2020). Dentro das células hospedeiras, os taquizoítas situam-se no interior de vacúolos parasitóforos e a rápida multiplicação envolve vias de sinalização dependentes de fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase (PI3K/Akt) (ZHOU et al., 2013). Os taquizoítas são metabolicamente ativos e demandam por muitos nutrientes das células hospedeiras (LÜDER; RAHMAN, 2017). Após 5 a 6 divisões, os taquizoítas egressam das células infectadas de maneira dependente de Ca^{2+} e infectam células vizinhas (BLADER et al., 2015).

Os bradizoítas representam a forma lenta de multiplicação do parasito dentro da célula hospedeira, levando à formação de cistos teciduais, que podem abrigar de centenas a milhares de parasitos (ATTIAS et al., 2020). Os cistos podem ficar alojados em vários tecidos do organismo por anos, como músculos, retina e cérebro. No interior dos cistos, os bradizoítas dividem-se por endodiogenia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

A formação de bradizoítas é um passo crítico para a transmissão de *T. gondii* e consequentemente o sucesso do parasito, pois os cistos teciduais são notoriamente refratários à ação do sistema imunológico e aos tratamentos com medicamentos. Ainda não é sabido se a resistência aos medicamentos é devido à natureza quiescente dos bradizoítas ou à baixa permeabilidade da parede dos cistos (SOKOL-BORRELLI; COOMBS; BOYLE, 2020). Dessa maneira, os cistos permanecem no hospedeiro um por longo período e assim favorecem a transmissão dos parasitos, independentemente da presença dos hospedeiros definitivos (SOKOL-BORRELLI; COOMBS; BOYLE, 2020).

Estruturalmente, os bradizoítas se diferem dos taquizoítas quanto a localização posterior do núcleo, presença de roptrias sólidas, número de micronemas e a presença de grânulos polissacarídeos (amilopectina) (FERGUSON; HUTCHISON, 1987; ATTIAS et al., 2020). Além do mais, durante o processo de diferenciação, o vacúolo parasitóforo dos taquizoítas é modificado para se tornar a parede do cisto, que é altamente glicosilada e de maior espessura (TOMITA et al., 2017; TU et al., 2019). Alterações metabólicas também são observadas, pois os bradizoítas parecem depender da glicólise anaeróbia, enquanto que os taquizoítas utilizam a respiração aeróbica para a produção de energia (SUGI et al., 2017).

A diferenciação de taquizoítas em bradizoítas é regulada pelo microambiente da célula hospedeira, podendo ser dependente de ciclo celular, metabolismo da célula hospedeira e devido a resposta inflamatória (LÜDER; RAHMAN, 2017). Em cultura celular, a diferenciação pode ser induzida por uma variedade de métodos, como indução de pH alcalino, choque de calor, privação de metabólitos e uso drogas (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004; SOKOL-BORRELLI; COOMBS; BOYLE, 2020), porém mecanismos moleculares ainda não são completamente elucidados. Estudos têm apontado alguns genes que regulam o processo de conversão dos estágios de taquizoítas em bradizoítas. Proteínas de ligação ao DNA AP2 (ApiAP2s) têm sido reportadas por serem essenciais para o processo de diferenciação, já que parasitos *knockouts* para ApiAP2s falharam em completar a diferenciação em bradizoítas (JEFFERS et al., 2018). Estudos recentes

sugeriram que o fator de transcrição semelhante a Myb (BFD1) é um fator chave para o desenvolvimento dos bradizoítas, mostrando que na ausência de BFD1 os parasitos se multiplicam rapidamente em condições de estresse *in vitro*, e são incapazes de formarem cistos em animais (WALDMAN et al., 2020).

Os esporozoítas estão localizados no interior de oocistos e são formados por meio da reprodução sexuada no intestino de hospedeiros definitivos, representados por felinos selvagens e domésticos, e são liberados para o meio ambiente juntamente às fezes destes animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; YAN et al., 2016; SHAPIRO et al., 2019). Os oocistos liberados não são esporulados e não conferem a capacidade de infectar hospedeiros; a esporulação e consequente capacidade de se tornarem infectantes depende de fatores ambientais, como humidade, calor e clima, ocorrendo entre 1 a 5 dias após a liberação no ambiente (YAN et al., 2016; SHAPIRO et al., 2019). Oocistos esporulados são considerados mais resistentes às variações ambientais do que os oocistos não esporulados e mantêm-se viáveis tanto em água quanto em ambientes secos por vários meses (SHAPIRO et al., 2019; ATTIAS et al., 2020). Oocistos imaturos apresentam um formato elíptico e contem no seu interior um único esporoblasto. Durante a esporulação, o oocisto divide-se em dois esporocistos e ao mesmo tempo ocorre o espessamento da parede do cisto. Ao final do processo de maturação e diferenciação, é formado quatro esporozoítas dentro de cada esporocisto (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ATTIAS et al., 2020).

A liberação de oocistos possui um importante papel na epidemiologia da toxoplasmose, tanto em termos de sua distribuição mundial, quanto pela extensa gama de hospedeiros intermediários infectados (SHAPIRO et al., 2019). A superfície do oocisto é hidrofílica, levemente adesiva e carregada negativamente em soluções de baixa força iônica, sugerindo que os oocistos podem ser mobilizados dos solos após chuvas intensas e se dispersar em ambientes de águas doces (SHAPIRO et al., 2009; DUMETRE et al., 2012, DUMETRE et al., 2013). As propriedades da parede do oocisto, portanto, desempenham um papel fundamental na dinâmica de transmissão de *T. gondii* através das paisagens, principalmente do ambiente terrestre para os habitats aquáticos, facilitando a exposição a inúmeras espécies hospedeiras que vivem em diferentes biótopos (DUMETRE et al., 2012).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxênico, tendo como hospedeiros definitivos os gêneros *Felis* e *Lynx*, e hospedeiros intermediários, aves e mamíferos incluindo o homem (YAN et al., 2016; ATTIAS et al., 2020). Os determinantes moleculares que

identificam apenas os felinos como hospedeiros definitivos para *T. gondii* ainda não são totalmente conhecidos. Porém, Martorelli di Genova e colaboradores (2019) mostraram que a deficiência na atividade da enzima delta-6-dessaturase no intestino de felinos é responsável pelo desenvolvimento do ciclo sexuado de *T. gondii*. Os felinos são os únicos mamíferos que carecem da atividade da enzima delta-6-dessaturase em seus intestinos, necessária para o metabolismo do ácido linoleico, resultando o excesso desse lipídio no organismo destes animais. A inibição dessa enzima em camundongos, juntamente com a suplementação nutricional com ácido linoléico permitiu que *T. gondii* desenvolvesse os estágios sexuais nesses animais, mostrando que a dieta do hospedeiro e o metabolismo moldam a coevolução com os microrganismos (MARTORELLI DI GENOVA; WILSON; DUBEY, 2019).

O ciclo sexuado do parasito ocorre quando os felinos ingerem oocistos infectantes ou cistos teciduais, a parede dessas estruturas é rompida no estômago, devido a ação do baixo pH e de enzimas proteolíticas, liberando os esporozoítas ou bradizoítas, respectivamente. Estes migram para o epitélio intestinal, e penetram nos enterócitos dos felinos e por esquizogonia transformam-se intracelularmente em esquizontes multinucleados, estágio de reprodução assexuada, após 3 a 7 dias de infecção. As subsequentes esquizogonias ocorrem dentro das células epiteliais no intestino dos felídeos. Durante a esquizogonia, ocorre sucessivas divisões nucleares que precede a individualização de cada célula. Em consequente, há a formação do complexo de membrana interna para a individualização de cada merozoíta e o aparecimento do complexo apical, incluindo micronemas e roptrias. Essas estruturas se organizam ao redor de cada núcleo, dando origem às células filhas, chamadas merozoítas, dentro da célula hospedeira. A ruptura dos enterócitos liberam muitos merozoítas, os quais também infectam novos enterócitos e dividem-se novamente por esquizogonia. Cada ciclo de esquizogonia libera inúmeros merozoítas que irão invadir novos enterócitos, aumentando exponencialmente o número de parasitos. Cinco tipos diferentes de esquizontes de *T. gondii* são descritos em células epiteliais intestinais de felinos antes do processo de formação dos gametas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ATTIAS et al., 2020). Três a quinze dias após a infecção primária do felino, os esquizontes e merozoítas são encontrados principalmente na porção do íleo no intestino, e alguns começam a se diferenciar em gametas. Macrogametas, gerados a partir de merozoítas, apresentam um formato oval e são imóveis; já os microgametas, formados por uma divisão de esquizontes, são alongados e flagelados. Após fertilização do gameta feminino pelo

gameta masculino, há a formação de um zigoto diploide que irá se desenvolver dentro dos oocistos. Estes por sua vez, caem na luz intestinal e são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais, e esporulam no meio ambiente sob condições favoráveis (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; YAN et al., 2016; ATTIAS et al., 2020). Durante a fase aguda da infecção os felinos podem liberar milhões de oocistos pelas fezes por aproximadamente uma a duas semanas (SHAPIRO et al., 2019).

O desenvolvimento assexuado começa no intestino dos hospedeiros intermediários quando oocistos no meio ambiente, ou cistos teciduais são ingeridos por uma vasta gama de animais, incluindo o homem. Inicialmente, esporozoítas ou bradizoítas são liberados a partir de oocistos ou cistos, respectivamente; penetram nos enterócitos e rapidamente se desenvolvem em taquizoítas, os quais multiplicam intensamente nas células nucleadas dentro do vacúolo parasitóforo. Os taquizoítas começam o processo de divisão por endodiogenia, nos quais duas células filhas são formadas no interior da célula mãe. Sucessivas divisões geram uma organização de taquizoítas conhecida como rosetas no interior do vacúolo parasitóforo. Após este processo, os taquizoítas, sob estímulo, são induzidos a saírem da célula, e ocorre o rompimento da membrana das células hospedeiras, liberando novos taquizoítas que irão infectar novas células. Este parasito pode ser disseminado pelo corpo através dos leucócitos no sangue, e uma vez estabelecida a infecção, o sistema imune do hospedeiro induz alterações nos taquizoítas, os quais começam a sofrer mudanças no metabolismo, diminuindo a taxa de divisão e convertem em bradizoítas e conseqüente formação de cistos teciduais, levando ao estágio crônico do ciclo assexuado (YAN et al., 2016; ATTIAS et al., 2020).

Os humanos podem ser infectados de diversas formas, por exemplo, ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos, ingestão de carne malcozida de bovinos, suínos e caprinos contendo cistos teciduais, transplante de órgãos, transfusão de sangue, contato direto com os parasitos em acidentes laboratoriais ou através de transmissão vertical (ROBERT-GANGNEUX, 2014; FOROUTAN-RAD et al., 2016; PEYRON et al., 2019; MARQUES et al., 2020). Há também evidências que o consumo de crustáceos marinhos crus ou malcozidos pode representar uma potencial via de transmissão de *T. gondii* para o homem, pois esses animais são filtradores e assim, os oocistos podem se acumular nas brânquias dos mesmos após o escoamento de solo contaminado para os recursos hídricos (SHAPIRO et al., 2019).

1.3. Toxoplasmose

Estima-se que aproximadamente 2 bilhões de pessoas estejam infectadas com *T. gondii* em todo o mundo, embora as maiores taxas de infecção sejam reportadas principalmente na América do Sul e sudeste da Ásia e da África (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009).

As manifestações clínicas da toxoplasmose foram primeiramente relatada no início dos anos 1920 entre crianças com encefalites, retinocoroidites e hidrocefalia. No início dos anos 1980, a toxoplasmose foi observada como uma das maiores infecções oportunistas entre pacientes imunocomprometidos devido à infecção por HIV (LIM; OTHMAN, 2014; AL-MALKI, 2021). Em indivíduos imunocompetentes, o início da infecção pode ocorrer de modo subclínico, ou com sintomas leves, podendo ser observado febre, dores de cabeça, dores musculares, mal-estar e linfadenopatia, (AL-MALKI, 2021). Quando a infecção crônica é estabelecida, e o indivíduo é imunocomprometido, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou que fazem uso de quimioterápicos para tratamentos de câncer, uso de medicamentos imunossupressivos para pacientes que foram submetidos à transplante de órgãos pode levar a reagudização da doença, devido a reativação dos bradizoítas presentes nos cistos teciduais que retornam ao estágio de taquizoítas e provocam graves problemas, como encefalite e lesões oculares, miocardites, pneumonia e pode ser fatal quando não tratada (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; JONES; PARISE; FIORE, 2014; SMITH et al., 2020, no prelo). Em torno de 30 a 40% de pacientes HIV positivos coinfectados com *T. gondii* desenvolveram encefalite toxoplásmica (WALKER; ZUNT, 2005).

A retinocoroidite toxoplásmica uma das manifestações mais comuns da doença acarreta grande problemas de saúde em todo o mundo. Entre os pacientes imunocomprometidos, a doença tem sido reportada posterior à uveíte devido à infecção adquirida ou congênita (PALANISAMY et al., 2006). De maneira geral, há uma alta prevalência de formas mais graves da toxoplasmose ocular na América do Sul, principalmente em algumas regiões do Brasil, se comparado com outras partes do mundo. Estas formas mais graves estão associadas à maior diversidade de cepas virulentas de *T. gondii* que circulam na região (SHWAB et al., 2018) combinadas com a alta ocorrência da infecção pela ingestão de oocistos, que desencadeia uma maior diversidade genética do que as infecções clonais derivadas de bradizoítas (GALAL et al., 2019).

1.4. Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita é considerada uma das formas mais graves da doença e ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação, alcançando assim a circulação e os tecidos fetais (KODJIKIAN, 2010; VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, 2016). Normalmente a infecção congênita ocorre quando a mulher adquire pela primeira vez a infecção por *T. gondii* durante a gestação ou próximo a concepção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, 2016; PEYRON et al., 2019).

A transmissão congênita do parasito não é obrigatória, e os principais fatores que influenciam a probabilidade de infecção embrionária/fetal e a gravidade dos problemas nos recém-nascidos envolve o período gestacional em que a infecção materna ocorre, a presença de tratamento ou não das gestantes e o tipo de cepa envolvida na infecção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KODJIKINA, 2010; VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, 2016; PEYRON et al., 2019). O risco geral de infecção fetal em mulheres que foram tratadas durante a gestação é em torno de 13%, mas essa taxa pode variar dependendo do período em que houve a infecção materna (LI et al., 2014). A probabilidade de haver infecção fetal quando a primo-infecção materna ocorre no período pré-concepção é de 2,2%; entretanto se a gestante adquire a infecção no primeiro ou segundo trimestre gestacional, a possibilidade de transmissão vertical oscila entre 10 a 20%, porém o comprometimento fetal é mais grave podendo ocasionar o aborto. Caso a infecção ocorra no terceiro trimestre, a possibilidade de infecção fetal varia entre 60 a 90%, mas o comprometimento fetal é menor (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KODJIKIAN, 2010; PEYRON et al., 2019).

Embora a toxoplasmose congênita ainda seja associada a uma primo-infecção durante a gestação, estudos têm demonstrado a possibilidade de transmissão congênita em gestantes cronicamente infectadas, atribuindo a casos de reinfeção com parasitos com genótipos diferentes ou cepas mais virulentas (GAVINET et al., 1997; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009). Franco e colaboradores (2015) observaram experimentalmente a infecção congênita em modelos animais utilizando fêmeas gestantes de *C. callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii* após serem reinfectadas com cepas não clonais do parasito.

Estudos demonstraram que infecções com as cepas de virulência intermediária (tipo II) possuem alta taxa de transmissão, porém a gravidade do acometimento fetal

depende principalmente do período gestacional em que ocorre a infecção; já infecções com a cepa do tipo I são frequentemente associadas a sintomas graves da doença, independente do período em que a infecção se estabelece (VARGAS-VILLAVICENCIO; BESNÉ-MÉRIDA; CORREA, 2016). Por outro lado, infecções com a cepa do tipo III levaram a infecções assintomáticas, uma vez que houve a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente indução da formação de cistos. Adicionalmente, infecções com cepas recombinantes resultaram em problemas congênitos mais graves, independente do período gestacional em que ocorreu a infecção (RICO-TORRES; VARGAS-VILLAVICENCIO; CORREA, 2016).

Quando mulheres são infectadas com *T. gondii* no primeiro trimestre de gestação, o parasito pode ser transmitido para o feto, podendo provocar abortos espontâneos ou problemas oculares e neurológicos, como retinocoroidite, calcificação intracraniana, microcefalia, estrabismo, cegueira, epilepsias, retardos psicomotor e mental e hidrocefalia (FATOOHI et al., 2002; LI et al., 2014; WALLON; PEYRON, 2018). No entanto, muitos recém-nascidos com toxoplasmose congênita podem ser assintomáticos no nascimento e poderão desenvolver a doença mais tardiamente, ao longo da vida, mais comumente, problemas oculares e também sintomas neurológicos e deficiências no desenvolvimento (WALLON; PEYRON, 2018).

A toxoplasmose congênita é um problema de saúde pública em muitos países, incluindo o Brasil. Estima-se que a incidência da toxoplasmose congênita varie em torno de 201.600 casos anualmente, equalizando 14,4 casos a cada 10.000 nascimentos no mundo (ROSTAMI et al., 2019). A alta taxa de prevalência de toxoplasmose congênita é associada à países com baixos níveis de renda per capita, baixas latitudes e longitude, baixa humidade e uma média alta da temperatura anual (ROSTAMI et al., 2019). Adicionalmente a esses dados, foi verificado uma alta taxa de infecção aguda por *T. gondii* em gestantes de regiões do Mediterrâneo oriental e África e baixas taxas na Europa (ROSTAMI et al., 2019; BIGNA et al., 2020), por outro lado, a infecção latente em gestantes é mais prevalente na América do Sul, enquanto que regiões do Pacífico ocidental detêm menores taxas de gestantes com infecções crônicas (ROSTAMI et al., 2020). No Brasil estima-se que cerca de 2700 crianças nasçam infectadas por *T. gondii* anualmente com uma incidência de 0,3 a 3,4 casos a cada 1000 recém-nascidos, o que amplia as necessidades de medidas preventivas e terapêuticas que visem minimizar a infecção congênita no país (DUBEY et al., 2012; DA SILVA et al., 2015) e com isso

reduzir os gastos públicos na saúde e reduzir significativamente os casos de abortos e problemas neurológicos ou oculares em crianças infectadas congenitamente.

1.5. Resposta imune a *T. gondii* e mecanismos de evasão

A resposta imunológica contra *T. gondii* é predominantemente uma resposta imune mediada por células. A ativação do sistema imune ocorre após o reconhecimento do parasito por receptores semelhantes a Toll (TLRs) dependentes do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), ou por receptores semelhantes a NOD (NLRs) durante a fase aguda da infecção (HOU et al, 2011; GORFU, 2014). Em camundongos, a imunidade inata é mediada pelo reconhecimento da proteína semelhante a profilina (TgPRF) pelos receptores TLR11 e TLR12, o qual é o principal mecanismo que conduz a produção de interleucina-12 (IL-12) e ligante 2 de quimiocina (CCL2) por células dendríticas (YAROVINSKY et al., 2005; KOBLANSKY et al., 2013; LIMA; LODOEN, 2019). Macrófagos e células dendríticas *knockout* para TLR12 (TLR12^{-/-}) falharam ao responder ao estímulo com TgPRF (KOBLANSKY et al., 2013). Animais *knockout* para TLR11 e infectados com *T. gondii* tiveram uma redução drástica da produção de IL-12, e conseqüentemente uma ineficiente resposta imune contra o parasito dependente da ativação de interferon-gama (IFN- γ) (KOBLANSKY et al., 2013; ZHU et al., 2019). *Toxoplasma* também possui ciclopilina 18 com habilidade em ligar-se ao receptor de quimiocina C-C tipo 5 (CCR5), além de outras moléculas de ancoragem do tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) e glicoinositolfosfolipídios (GIPLs), e proteínas de choque térmico 70 (HSP70) que são reconhecidos por TLR2, TLR4 e TLR11 (PLATTNER et al., 2008; MELO; JENSEN; SAEJI, 2011). A ativação de TLRs desencadeia vias dependentes de MyD88, que culminam na rápida ativação do fator de transcrição de fator nuclear κ B (NF- κ B). No entanto, dependendo do tipo de cepa do parasito, a ativação de NF- κ B pode ocorrer diretamente ou independentemente de MyD88 (MELO; JENSEN; SAEJI, 2011). Como resultado da ativação de NF- κ B, ocorre a transcrição de inúmeros genes e conseqüente síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1beta (IL-1 β), IL-12, interleucina-18 (IL-18), e indução da produção de óxido nítrico sintase (iNOS) e de alguns NLRs (MELO; JENSEN; SAEJI, 2011). Tanto os receptores de IL-1 β quanto de IL-18 ativam NF- κ B e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e desencadeiam a produção de mais citocinas pró-inflamatórias. A secreção de IL-1 β e IL-18 amplifica a produção de IFN- γ por células *natural killer* (NK) (MELO; JENSEN; SAEJI, 2011).

Notavelmente, TLR11 não é funcional em humanos, e TLR12 não existe no genoma humano, indicando que mecanismos alternativos de reconhecimento do parasito em células humanas (LIMA; LODOEN, 2019). Uma pesquisa recente revelou que o sistema de reconhecimento de *T. gondii* em células humanas é baseado na detecção de proteína A1 de ligação ao cálcio S100 (S100A11), uma molécula associada ao dano celular, liberada por células infectadas. Esta alarmina envolve receptores de produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) e inicia uma via de sinalização levando a indução de CCL2, que regula o recrutamento de monócitos para o sítio de infecção, e é considerada essencial para a resistência de células hospedeiras ao parasito (SAFRONOVA et al., 2019). Dessa maneira, ao contrário das células de camundongo que produzem grandes níveis de IL-12, as células humanas produzem CCL2.

A membros da família IL-1 são responsáveis pela ativação da família de receptores inatos citoplasmáticos NLRs que reconhecem diferentes classes de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), desencadeando a oligomerização e recrutamento de adaptadores moleculares ASC, ativação de caspase-1, conversão das pró-formas de IL-1 β , IL-18 e interleucina-33 (IL-33) em citocinas bioativas e indução de vias de morte celular, conhecida como piroptose. Todos esses eventos em cascata levam a formação de um complexo multimolecular chamado de inflamassoma que é considerado um mecanismo da resposta imune inata essencial para identificar microrganismos (ADACHI et al., 1998; MELO; JENSEN; SAEJI, 2011; LÓPEZ-YGLESÍAS et al., 2019). Tem sido demonstrado que *T. gondii* é reconhecido pelos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 resultando na produção de IL-1 β e IL-18 tanto *in vitro* quanto *in vivo* (EWALD, CHAVARRIA-SMITH; BOOTHROYD, 2014; GORFU et al., 2014). Foi evidenciado que a ativação do inflamassoma e produção de IL-18 após a infecção por *T. gondii* foi crítico para manter uma resposta robusta e protetora de IFN- γ mesmo na ausência de TLR11 (LÓPEZ-YGLESÍAS et al., 2019). Já IL-33 também aparece após a infecção por *T. gondii*, e sua produção é principalmente por fibroblastos e células endoteliais, e seu receptor também transduz sinais através da via dependente de MyD88, mas ao invés de produzir citocinas pró inflamatórias, ocasiona a produção de um perfil de resposta Th2. Então, é claro a habilidade do parasito em iniciar ambas as vias, pró e anti-inflamatória da resposta imune, através de IL-1 β e IL-18 ou IL-33 (MELO; JENSEN; SAEJI, 2011).

O reconhecimento de *T. gondii* pela resposta imune inata promove a secreção de IL-12 por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos que são recrutados para o sítio de infecção. IL-12, por sua vez, estimula a ativação de transdutor de sinal e ativador de

transcrição 4 (STAT4) e resulta na diferenciação de células TCD4⁺, TCD8⁺ e células NK, as quais medeiam a citotoxicidade e produção de altas concentrações de IFN- γ , o que garante o estabelecimento de uma imunidade celular do tipo 1 ou Th1 (GAZZINELLI et al., 1994; KOBLANSKY et al., 2013; ZHU et al., 2019). IFN- γ é a principal citocina responsável pela ativação de uma variedade de atividades microbicidas em células hematopoéticas e não hematopoéticas que limitam a replicação do parasito (HUNTER; SIBLEY, 2013; ZHU et al., 2019).

IFN- γ ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), culminando na expressão de genes efetores como p47 GTPases, as quais auxiliam na destruição o parasito (KEMP; YAMAMOTO; SOLDATI-FAVRE, 2013; ZHU et al., 2019). Desencadeia a produção de diversos mecanismos microbicidas intracelulares como produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos, os quais podem proporcionar danos ao parasito e impede o seu crescimento dentro de macrófagos. Também é descrito por promover o recrutamento de células TCD8⁺ pelo aumento da expressão de moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1), citotoxicidade de linfócitos TCD8⁺ e aumento da expressão de moléculas de histocompatibilidade classe II.

É sabido que IFN- γ promove a privação de ferro em enterócitos infectados e indução da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) que induz a degradação do triptofano e como consequência, inibe o crescimento do parasito, permitindo o estabelecimento da infecção crônica, com a formação de cistos teciduais (GAZZINELLI et al., 1994; FUJIGAKI et al., 2002; SANECKA; FRICKEL, 2014;; ZHU et al., 2019). Além do mais, IFN- γ estimula a indução de proteínas GTPase relacionadas à imunidade (IRG) e proteínas ligantes de guanilato (GBPs) para destruição da membrana do vacúolo parasitóforo (ZHU et al., 2019). IFN- γ é crucial para a manutenção da latência da infecção crônica e previne a reativação da infecção (SA; WOODWARD; ZUZUKI, 2013).

Interleucina-2 (IL-2), uma citocina pró-inflamatória e inicialmente descrita como fator primário de crescimento de células T, tem diversas funções na regulação não apenas da proliferação, mas também no desenvolvimento de células T CD8⁺ após o estímulo com antígenos (SA; WOODWARD; ZUZUKI, 2013) e é essencial para promover a resistência a infecção aguda por *T. gondii* e manutenção da latência durante a infecção crônica, uma vez que IL-2 mostrou ser importante para aumentar a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ durante a resposta secundária ao parasito. IL-2 foi capaz de elevar os níveis de IFN- γ sem interferir na proliferação de células T. Adicionalmente, IL-2 mostrou facilitar a

diferenciação de célula T CD8⁺ de memória em células efectoras para produzirem maiores níveis de IFN- γ e/ou ter atividade citotóxica na resposta contra *T. gondii* (SA; WOODWARD; ZUZUKI, 2013).

Embora IFN- γ promova atividades antimicrobianas em inúmeros tipos celulares, em macrófagos, esta resposta não é suficiente para controlar o parasitismo, e um segundo sinal é requerido para o controle da proliferação de *T. gondii*. O mais bem caracterizado segundo sinal que promove controle do parasito *in vitro* é a citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ou sinais desencadeados através de CD40, ambos utilizam a via de sinalização através do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (ANDRADE et al., 2006; HUNTER; SIBLEY, 2013).

Além das citocinas pró-inflamatórias citadas, *T. gondii* também induz a produção de interleucina-17A (IL-17A) (PASSOS et al., 2010) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) (FLORES et al., 2008). A sinalização dependente de IL-17 parece ser importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção e controle do parasitismo nos estágios iniciais da infecção (KELLY et al., 2005; SILVA et al., 2014); enquanto que MIF demonstrou ser de extrema importância para o controle de *T. gondii* (FLORES et al., 2008).

Camundongos MIF *knockout* (MIF^{-/-}) foram mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* quando infectados pelas cepas ME-49 ou RH em relação aos animais não geneticamente modificados (FLORES et al., 2008). A maior susceptibilidade dos animais MIF^{-/-} ao parasito foi consequência da produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-18 pelas células dendríticas (FLORES et al., 2008). De maneira semelhante, Cavalcanti e colaboradores (2011) observaram que a presença de MIF induziu a produção IL-12, TNF- α e interleucina-23 (IL-23) no intestino de camundongos infectados com *T. gondii*. Além disso, células dendríticas provenientes de camundongos MIF^{-/-} falharam no processo de maturação, pois expressaram baixos níveis de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40, o que prejudicou a resposta imune inata contra *T. gondii* (TERRAZAS et al., 2010). De forma interessante, recentemente foi descrito que *T. gondii* sintetiza um homólogo de MIF, que foi denominado de TgMIF1, o qual tem a habilidade de modular a resposta imune do hospedeiro, uma vez que ativa MAPK, especialmente ERK1/2, e induz a produção de IL-8 em células mononucleares de sangue periférico humano, importante mediador inflamatório com função de recrutar neutrófilos para o sítio de infecção (SOMMERVILLE et al., 2013). Finalmente, alguns trabalhos do nosso grupo de pesquisa

mostraram o importante papel de MIF nos processos inflamatórios e no controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal, especialmente em células trofoblásticas humanas (FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2011; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que a ausência total de MIF foi associado à atenuação da patologia na toxoplasmose congênita, mas resultou na morte de fêmeas de camundongos infectadas provavelmente por causa da infecção descontrolada (GOMES et al., 2018).

Outro mecanismo descrito que permite a latência do parasito é a presença de receptores semelhantes a Sort (TgSORTLR) e TgARO *T. gondii armadillo repeats only protein*, proteínas responsáveis por organizar as roptrias na porção apical do parasito, que medeiam o tráfico de organelas do complexo apical do parasito e a subsequente secreção de fatores de virulência. Animais que foram desafiados com parasitos *knockout* para as proteínas TgSORTL e TgARO e novamente infectados com parasitos que não apresentaram a modificação para a expressão das proteínas, falharam no desenvolvimento de uma resposta protetora, ocasionando na morte destes animais. Dessa maneira a ausência destas duas proteínas inibiu completamente desenvolvimento da imunidade adaptativa dependente de células T, IFN- γ e interleucina-10 (IL-10), e comprometeram a função da imunidade inata mediada por células NK. Estes resultados indicam que a secreção de antígenos pelas organelas apicais é essencial para promover uma resposta imune protetora contra *T. gondii* (SLOVES et al., 2015).

De maneira geral, os mecanismos efetores da resposta imune estão sob controle de fatores de transcrição que são regulados positivamente para combater microrganismos invasores. Por sua vez, patógenos tem desenvolvido estratégias para evadir da resposta imune do hospedeiro. A infecção por *T. gondii* induz inúmeras alterações na célula hospedeira, incluindo alteração na transcrição de genes envolvidos no metabolismo, na resposta imune e na sinalização (KEMP; YAMAMOTO; SOLDATI-FAVRE, 2013; LIMA; LODOEN, 2019). Durante a resposta imune, a ativação de vias anti-inflamatórias é essencial para balancear a resposta pró-inflamatória e prevenir uma multiplicação muito intensa do parasito dentro das células, o que levaria a danos no hospedeiro (ZHU et al., 2019). Uma vez estabelecida a infecção, a citocina IL-10 ativa transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3), e ao mesmo tempo, interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) induzem a ativação de STAT6 e ocorre uma modulação negativa da resposta Th1 pró-inflamatória (KEMP; YAMAMOTO; SOLDATI-FAVRE, 2013).

Para a supressão da resposta altamente pró-inflamatória, as células T reguladoras (Treg) podem ser ativadas. Estas células são uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ requeridas para a manutenção da homeostase e auto tolerância imunológica por suprimir respostas imunes patológicas e fisiológicas (OHKURA; KITAGAWA; SAKAGUCHI, 2013). Em uma infecção por *T. gondii*, essas células podem modular negativamente uma resposta exacerbada, favorecendo a sobrevivência tanto do hospedeiro, quanto do parasito. Além disso, a supressão de uma resposta imune eficiente pode promover a persistência do parasito que é prejudicial ao hospedeiro (OHKURA; KITAGAWA; SAKAGUCHI, 2013). A infecção por *T. gondii* normalmente resulta em uma redução transitória do número de célula Treg durante a fase aguda, como consequência da baixa produção de IL-2. Porém, se a infecção gerar uma resposta altamente inflamatória, essas células são ativadas para impedir que a presença do parasito cause danos ao hospedeiro (SALINAS et al., 2013; OLGUÍN et al., 2015).

Adicionalmente, o parasito secreta ativamente proteínas efetoras através das roptrias e grânulos densos, que são fundamentais na manipulação da sinalização da célula hospedeira e das respostas transcricionais (LIMA; LODOEN, 2019). Sabe-se que a infecção pode ocasionar a inibição de algumas vias de sinalização envolvidas na imunidade protetora, bloqueando STAT1 e NF- κ B, tornando os parasitos resistentes à ação de IFN- γ . Foi identificado em *T. gondii*, o inibidor da transcrição dependente de STAT1 (TgIST), um fator conservado do parasita entre as cepas de *T. gondii* que é capaz de bloquear a transcrição de genes estimulados por IFN- γ (GAY et al., 2016). O parasito pode ainda regular positivamente vias de sinalização anti-inflamatórias, incluindo supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS1), supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) e STAT3, potencialmente comprometendo os mecanismos de controle das células hospedeira (HUNTER; SIBLEY, 2013). A proteína ROP16 é responsável pela fosforilação e ativação de STAT3 em células humanas e murinas (YAMAMOTO et al, 2009). Em macrófagos murinos, GRA18 foi identificado como capaz de reprogramar uma resposta inflamatória, pois induz genes dependentes de β -catenina associados à resposta anti-inflamatória (HE et al., 2018). A apoptose é outro processo que é alterado nas células hospedeiras após a infecção por *T. gondii*. *T. gondii* pode inibir a via intrínseca mediada pela via mitocondrial através da inibição da liberação de citocromo c, e a via extrínseca, mediado pelo receptor de morte, reduzindo a clivagem das capases-9 e caspases-3 nas células infectadas. Esse mecanismo garante o seu nicho intracelular, uma vez que as

células permaneçam viáveis por mais tempo, favorece a replicação do parasito e evita a eliminação através da imunidade humoral (LIMA; LODOEN 2019).

1.6. Migração de *T. gondii*

De maneira geral, a resposta imune desencadeada contra *T. gondii* é muito importante para controlar o parasitismo, mas ela não elimina completamente a infecção no hospedeiro. Assim, taquizoítas conseguem rapidamente se espalhar do local inicial da infecção para órgãos mais distantes. Para isso, o parasito precisa quebrar inúmeras barreiras biológicas, incluindo migrar para fora da mucosa intestinal, alcançar vasos linfáticos e sanguíneos, e finalmente alcançar os órgãos considerados imunoprivilegiados, como cérebro, retina e placenta (HARKER; UENO; LODOEN, 2015).

Toxoplasma gondii pode migrar pelos tecidos extracelularmente, atravessando a barreira celular pela via paracelular, no qual o parasito com o auxílio de sua motilidade do tipo *gliding*, se move através das junções intercelulares sem alterar a integridade da barreira. Foi também demonstrado que o parasito se aglomera entre as junções celulares e transmigra através do epitélio (WEIGHT; CARDING, 2012; JONES; KORCSMAROS; CARDING, 2017). Ademais, proteínas ocludinas foram identificadas como alvos específicos dos taquizoítas durante a passagem através da via paracelular, demonstrando que as ocludinas atuam como receptores do parasito durante a transmigração com potencial de interação entre *T. gondii* e os domínios extracelulares da proteína (WEIGHT et al., 2015).

Outro mecanismo descrito de disseminação do parasito é pela penetração pela membrana celular apical e passando pela porção basolateral, a fim de alcançar a lâmina própria subjacente onde os leucócitos residem (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005; LAMBERT; BARRAGAN, 2010).

Também foi demonstrado que o parasito pode utilizar de moléculas de adesão presentes na superfície das células hospedeiras através da ligação de MIC-2 e ICAM-1 para atravessarem barreiras biológicas (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005). Também o faz pela via mais comum, a intracelular, na qual o parasito infecta células do sistema imune, como células dendríticas e monócitos - “cavalos de Tróia” - importantes para a disseminação do parasito pelo corpo do hospedeiro (ROBBINS et al., 2012). Essas células possuem ligantes específicos que interagem com moléculas de adesão, como ICAM-1, permitindo a migração pelas células endoteliais até alcançarem os tecidos (LAMBERT et al., 2006; FURTADO et al., 2012; HARKER; UENO; LODOEN, 2015).

Está demonstrado que ICAM-1 é uma molécula envolvida na migração do parasito para os tecidos imunologicamente privilegiados. Assim, durante a infecção por *T. gondii*, aumenta-se a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IFN- γ e IL-6 e, conseqüentemente, há um aumento da expressão de ICAM-1 em células endoteliais do cérebro e células epiteliais da retina (NAGINENI; DETRICK; HOOKS, 2000; LACHENMAIER et al., 2011; SA; WOODWARD; ZUZUKI, 2014; CHENG et al., 2019). Isso caracteriza um fenótipo conhecido como “células ativadas”, resultando em aumento dos níveis de moléculas de adesão, além da diminuição da integridade das junções de oclusão, resultando no aumento da permeabilidade da barreira celular (DEWI; TAKASAKI; KURANE, 2004; HARKER et al., 2014; SARELIUS; GLADING, 2015). Pfaff e colaboradores (2005) demonstraram que monócitos infectados com *T. gondii* se aderiram mais facilmente em células trofoblásticas de maneira ICAM-1 dependente. Estudos sugerem, ademais, que o parasito alcança a decídua dentro de leucócitos e que estes se ligam, preferencialmente, à trofoblastos extravilosos presentes no microambiente placentário. Após a lise das células “cavalos de Tróia”, o parasito consegue invadir células da placenta (ROBBINS et al., 2012).

CAPÍTULO I

Papel funcional da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii* em modelos murinos

1. INTRODUÇÃO

1.1. ICAM-1 e a adesão de *T. gondii* no trofoblasto

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), também conhecida como CD54, foi identificada pela primeira vez em 1986 por Rothlein e colaboradores (1986). ICAM-1 pertence ao grupo da superfamília das imunoglobulinas (Ig), composto por cinco domínios semelhantes à imunoglobulina, com uma região transmembrânica e um pequeno domínio citoplasmático carboxi-terminal, e é caracterizada por altos níveis de glicosilação (STAUNTON et al., 1990; BUI; WIESOLEK; SUMAGIN, 2020). A glicoproteína ICAM-1 exibe uma heterogeneidade relativa da massa molecular em diferentes tipos celulares, o qual pode variar entre 60 e 114 kDa, dependendo da extensão da glicosilação dos domínios Ig (STAUNTON et al., 1990). Esses domínios de Ig glicosilados medeiam as interações de ICAM-1 com seus ligantes. Após a ligação, ICAM-1 sofre dimerização e agrupamento por meio de ligação homotípica entre os domínios de Ig 3 e 4 (CHEN et al., 2007), o que aumenta significativamente a afinidade de ligação de ICAM-1 aos seus ligantes cognatos β 2-integrinas do antígeno associado à função linfocitária 1 (LFA-1; CD11a/CD18) e antígeno de macrófago 1 (Mac-1; CD11b/CD18) (MILLER et al., 1995; FRICK et al., 2005). LFA-1 e Mac-1 são conhecidos por se ligarem aos domínios 1 e 3 de Ig, respectivamente (DIAMOND et al., 1991). Ao se ligar à LFA-1/Mac-1, ICAM-1 contribui para a regulação de respostas inflamatórias e imunes, que promovem a adesão de leucócitos, transdução de sinal e ativação de células T (TEIJEIRA et al., 2017).

ICAM-1 é constitutivamente expressa em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo linfócitos B, linfócitos T ativados, células endoteliais, células epiteliais, monócitos/macrófagos, fibroblastos, células dendríticas, além de outros tipos celulares, como os presentes na placenta: citotrofoblasto e sinciotrofoblasto (GAFFURI et al., 1998; EGAL et al., 2014; BENEDICTO; ROMAYOR; ARTETA, 2017; YU; SHANG; JIANG, 2020). Ferro e colaboradores (2008) mostraram que a expressão de ICAM-1 no primeiro trimestre gestacional ocorre principalmente no sinciotrofoblasto, estroma e em algumas células endoteliais fetais de tecidos placentários humanos.

Esta molécula desempenha um papel muito importante no fenômeno de adesão envolvido na migração transendotelial de leucócitos, ativação de células T e formação de sinapses imunológicas entre leucócitos, leucócitos e células endoteliais e entre leucócitos e células epiteliais (EGAL, et al., 2014; TEIJEIRA et al., 2017). Especificamente na placenta, acredita-se que ICAM-1 desempenha um importante papel na migração de

células maternas, dentro dos vilos placentários (EGAL et al., 2014). Mais recentemente, estudos têm identificado vários novos papéis de ICAM-1 em respostas de resolução de lesão epitelial, respostas imunes inatas e adaptativas na inflamação e tumorigênese (KONG et al., 2018; MOSLEY et al., 2020). É importante ressaltar que ICAM-1 funciona como um biossensor para transduzir a sinalização externa por meio da associação de seu domínio citoplasmático com o citoesqueleto de actina após a ativação do ligante do domínio extracelular (BUI; WIESOLEK; SUMAGIN, 2020). Assim, ICAM-1 emergiu como um regulador mestre de muitas funções celulares essenciais do tecido, tanto no início quanto na resolução de condições patológicas (BUI; WIESOLEK; SUMAGIN, 2020).

Na maioria dos tipos celulares e sob condições não inflamatórias, a expressão de ICAM-1 é constitutivamente baixa, e geralmente detectada apenas em células endoteliais. No entanto, citocinas como TNF- α , IL-1 β , INF- γ ou estímulos exógenos, como lipossacarídeo bacteriano (LPS) potencializam a expressão desta molécula na superfície das células (POBER et al., 1986; LEE; BENVENISTE, 1999; RAMOS; BULLARD; BARNUM, 2014; ISHIDA et al., 2016; ZHAO et al., 2017). Tais estímulos regulam principalmente a expressão de ICAM-1 por meio da ativação da transcrição do gene ICAM1, via NF- κ B, proteína quinase C (PKC) ou via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (BODIGA et al., 2016; HUANG et al., 2018).

Em células da interface materno-fetal, ICAM-1 também é encontrada em baixos níveis (GAFFURI et al., 1998; EGAL et al., 2014), sendo que, no sinciotrofoblasto, favorece a adesão celular e a migração de células da mãe para o feto (LABARRERE et al., 2014). Durante uma gestação normal, a expressão de ICAM-1 é regulada negativamente nas células trofoblásticas, sugerindo que isto ocorra para diminuir a resposta imune contra antígenos paternos, representando um perfil anti-inflamatório/tolerogênico (ABUMAREE; STONE; CHAMLEY, 2006). Todavia, pode ser regulada positivamente por inúmeros fatores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, inflamações no vilos placentários, intervilosites massivas crônicas e presença de patógenos como *Plasmodium falciparum*, citomegalovírus e HIV-1, (SUGIYAMA et al., 2000; ARIAS; MUÑOZ; MUÑOZ-FERNANDES, 2003; CHAN; STINSKI; GUILBERT, 2004; LABARRERE et al., 2005; JULIANO; BLOTTA; ALTEMANI, 2006; KULKARNI et al., 2016; YU; SHANG; JIANG; 2020).

Estudos mostraram que houve uma maior expressão de ICAM-1 no sinciotrofoblasto de placentas que apresentaram inflamações nos vilos se comparado

com placentas saudáveis (EGAL et al., 2014). Labarrere e colaboradores (2014) demonstraram que há uma associação entre a alta expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto e a presença de intervilosites massivas crônicas. Como essas lesões na placenta humana são caracterizadas por um infiltrado de células mononucleares nos espaços intervilosos, sugere-se que macrófagos maternos e linfócitos T secretem citocinas que são capazes de induzir a expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto (LABARRERE et al., 2014). A ativação de células endoteliais por agentes inflamatórios ou infecciosos aumentam as propriedades adesivas dessas barreiras biológicas através do aumento da expressão de moléculas como ICAM-1 (XIAO et al., 1997; ARIAS; MUÑOZ; MUÑOZ-FERNANDES, 2003; CHAN; STINSKI; GUILBERT, 2004; LABARRERE et al., 2014).

Demonstrou-se, em adição a isso, que sinciciotrofoblasto em cultura de células são capazes de modular positivamente a expressão de ICAM-1 após serem incubados com citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , logo houve maior adesão de monócitos via LFA-1 (XIAO et al., 1997). Mais ainda, foi mostrado que IL-1 β , IFN- γ e TNF- α proporcionaram maior expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) (PFAFF et al., 2005). Ferro e colaboradores (2008) também avaliaram que MIF foi capaz de induzir um aumento da expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto de vilos de primeiro trimestre, com aumento da adesão de células THP-1 aos explantes de vilos placentários humanos.

Alguns patógenos também têm sido relacionados com o aumento da expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas. Maubert e colaboradores (1997), por exemplo, observaram maior expressão desta molécula no sinciciotrofoblasto de placentas a termo infectadas por *P. falciparum*, principalmente quando tratados com TNF- α . Estudos *in vitro* também avaliaram a alta expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto infectado pelo vírus HIV-1 e citomegalovírus (ARIAS; MUÑOZ; MUÑOZ-FERNANDES, 2003; CHAN; STINSKI; GUILBERT, 2004). Ainda nesse sentido, placentas com inflamações provocadas por *Trypanosoma cruzi* ou *T. gondii* tiveram influxo de macrófagos, linfócitos e granulócitos, já que a expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto proporcionou a adesão dessas células de defesa e, simultaneamente, favoreceu a infecção do tecido placentário (JULIANO; BLOTTA; ALTERMANI, 2006).

Pfaff e colaboradores (2005) demonstraram que citocinas pró-inflamatórias produzidas por células mononucleares de sangue periférico (PBMC), infectadas por *T. gondii*, aumentaram a expressão de ICAM-1 em células trofoblásticas BeWo, levando a maior adesão de monócitos (THP-1) às células BeWo. Outro estudo demonstrou que

vilos estimulados com antígeno solúvel de *T. gondii* aumentaram a expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto (FERRO et al., 2008). Coletivamente, esses estudos sugerem que ICAM-1 pode influenciar e facilitar a transferência de patógenos, incluindo *T. gondii*, através da barreira placentária (ARIAS; MUÑOZ; MUÑOZ-FERNANDES, 2003, ROBBINS et al., 2012).

T. gondii possui uma conservada família de adesinas transmembrânicas denominadas de MIC2, a qual interage com ICAM-1 presente na célula hospedeira. Portanto, é possível que *T. gondii* faça uso dessa molécula para migrar até locais do organismo considerados imunologicamente privilegiados, como o microambiente placentário (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005).

Conclusivamente, estudos que demonstrem o papel de ICAM-1 durante a transmissão transplacentária de *T. gondii* são extremamente necessários para verificar o papel dessa molécula no desencadeamento da toxoplasmose congênita.

2. JUSTIFICATIVA

A passagem transplacentária de *T. gondii* é uma das maiores complicações decorrentes da infecção, além do mais, envolve a participação de diversas proteínas, citocinas e moléculas de adesão. Considerando que ICAM-1 é uma molécula importante na regulação da resposta imunológica através do recrutamento de células imunológicas para sítios de infecção e o estabelecimento de sinapses imunológicas, é expressa na interface materno-fetal, e que é regulada por patógenos como *T. gondii*, é plausível que ICAM-1 esteja envolvida na transmissão vertical do parasito. Portanto, estudos que investiguem a função de ICAM-1 na passagem transplacentária de *T. gondii* podem esclarecer os mecanismos envolvidos na transmissão do parasito para o feto e gerar conhecimentos para o estabelecimento futuro de novas estratégias terapêuticas no combate à infecção congênita.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a participação funcional de ICAM-1 na susceptibilidade à infecção por *T. gondii* e na passagem transplacentária do parasito em modelos experimentais murinos C57BL/6 ICAM-1 *knockouts* e C57BL/6 tipo selvagens.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar taxas de perda embrionária e número de sítios de implantação em fêmeas ICAM-1^{-/-} ou WT infectadas ou não por *T. gondii* em diferentes estágios gestacionais.
- Verificar a carga parasitária em tecido uterino gravídico com 8 dias de gestação (terço inicial da gestação) em fêmeas ICAM-1^{-/-} ou WT infectadas por *T. gondii* no 1º dia de gestação.
- Verificar a carga parasitária em placentas e embriões com 14 dias de gestação (terço médio da gestação) em fêmeas ICAM-1^{-/-} ou WT infectadas por *T. gondii* no 8º dia de gestação.
- Verificar a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17 e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) no soro de fêmeas ICAM-1^{-/-} ou WT infectadas ou não por *T. gondii* com 8 e 14 dias de gestação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais de experimentação

Camundongos C57BL/6 ICAM-1^{-/-} e C57BL/6 WT foram mantidos na Rede de Biotério de Roedores (REBIR) da UFU, em condições livres de patógenos específicos. Os roedores foram mantidos com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro e com dieta *ad libitum* composta de ração apropriada autoclavada e água filtrada. Todos os procedimentos experimentais usando estes animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), e foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sob o n° de protocolo 142/16 (ANEXO I).

4.2. Manutenção da cepa ME-49 de *T. gondii*

Machos de roedores *Calomys callosus* (linhagem Canabrava) foram mantidos no biotério de pequenos roedores pertencente ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFU, bloco 2B, andar superior. Os roedores foram mantidos com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, sob condições livres de patógenos e com dieta *ad libitum* composta de ração apropriada e água filtrada. Todos os procedimentos experimentais usando estes animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi mantida em encéfalos de *C. callosus* machos de acordo com Barbosa e colaboradores (2007). Brevemente, *C. callosus* machos previamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* foram anestesiados com solução de xilazina (10mg/kg) (Syntec, Hortolândia, SP, Brasil) e cetamina (100mg/kg) (Syntec) e eutanasiados por deslocamento cervical. Os encéfalos dos animais foram removidos assepticamente, lavados, macerados e homogeneizados em PBS estéril (pH 7.0) por aspiração usando seringa de 5mL e agulha de 25x7mm; e posteriormente centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente. Alíquotas de 20µL da solução obtida foram observadas em microscópio de luz (objetiva 10x) para contagem de cistos teciduais contendo bradizoítas no interior.

4.3. Grupos experimentais

Fêmeas e machos virgens de camundongos e C57BL/6 *knockouts* para ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) e C57BL/6 tipo selvagem (WT) entre 2 e 3 meses de idade e com massa

corporal em torno de 20g, foram usadas para realização dos procedimentos experimentais. Estas fêmeas foram colocadas para acasalar com os machos em gaiolas na proporção de duas fêmeas para cada macho e, diariamente, a presença da rolha vaginal foi avaliada. A rolha vaginal é uma mistura de sêmen e secreção vaginal presente na vagina da fêmea e representa um indício de acasalamento, sendo, portanto, considerada como o primeiro dia de gestação.

As fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT em que foram detectadas a rolha vaginal foram infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, proveniente de machos de *C. callosus* previamente infectados, conforme descrito no item anterior. Finalmente, estas fêmeas foram divididas em 4 grupos experimentais diferentes (grupos I, II, III e IV) contendo 12 animais cada, sendo 6 fêmeas ICAM-1^{-/-} e 6 fêmeas WT por grupo. Como controles, fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT que apresentaram a rolha vaginal não foram infectadas por *T. gondii* e foram utilizadas como controle para avaliar o percurso da gestação. Estas fêmeas foram divididas em 3 grupos experimentais diferentes (V, VI e VII) contendo 12 animais cada, sendo 6 fêmeas ICAM-1^{-/-} e 6 fêmeas WT por grupo. Portanto, para esse trabalho, foram utilizadas um total de 84 fêmeas, sendo 42 fêmeas ICAM-1^{-/-} e 42 fêmeas WT. Para realizarmos o acasalamento das fêmeas, foram utilizados 42 machos, sendo 21 machos de camundongos ICAM-1^{-/-} e 21 machos WT. Abaixo, está detalhado o delineamento experimental de cada grupo.

O grupo I foi formado por fêmeas prenhes ICAM-1^{-/-} e fêmeas prenhes WT, infectadas no primeiro dia de gestação (dia de observação da rolha vaginal) com 5 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) pela via oral, e eutanasiadas no 8º dia de gestação/8º dia infecção (Figura 1A).

O grupo II foi formado por fêmeas prenhes ICAM-1^{-/-} e fêmeas prenhes WT, infectadas com 5 cistos de *T. gondii* no 8º dia de gestação e eutanasiadas no 14º dia de gestação/7º dia infecção (Figura 1B).

O grupo III foi composto por fêmeas prenhes ICAM-1^{-/-} e fêmeas prenhes WT, infectadas no 8º dia de gestação e eutanasiadas no 19º dia de gestação/12º infecção (Figura 1C).

O grupo IV foi formado por fêmeas prenhes ICAM-1^{-/-} e fêmeas prenhes WT, infectadas no 12º dia de gestação e eutanasiadas no 19º dia de gestação/8º dia de infecção (Figura 1D).

Os grupos V, VI e VII foram compostos por fêmeas prenhes ICAM-1^{-/-} e fêmeas prenhes WT em cada grupo, não infectadas em nenhum momento da gestação. As fêmeas

dos grupos V, VI e VII foram eutanasiadas no 8º, 14º e 19º dia de gestação, respectivamente (Figura 1E-G).

As fêmeas de todos os grupos experimentais (grupos I ao VII), de acordo com cada período de gestação/infecção conforme descrito anteriormente foram anestesiadas previamente com solução de xilazina (10mg/kg) (Syntec) e cetamina (100mg/kg) (Syntec). Após anestesia, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital para dosagem de citocinas. Em seguida, as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical. Com o uso de tesouras, pinças e bisturis, cornos uterinos e demais órgãos maternos (fígado, encéfalo, baço, pulmão, coração e intestino) foram coletados de fêmeas pertencentes aos grupos I e V (8º dia de gestação/com ou sem infecção), e placentas, fetos e órgãos maternos foram coletados de fêmeas pertencentes aos grupos II, III, IV, VI e VII (14º ou 19º dia de gestação/com ou sem infecção). O número de fetos, bem como o número de sítios de implantação foram avaliados em todos os grupos experimentais. Placentas, cornos uterinos gravídicos, e tecidos fetais das fêmeas pertencentes aos grupos I e II foram utilizados para realização de qPCR (reação em cadeia de polimerase) em tempo real.

O número de sítios de implantação foi avaliado e quantificado quanto à presença de embriões/fetos em desenvolvimento aparentemente normais nos cornos uterinos gravídicos de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT. Por outro lado, a taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações. Os sítios de reabsorção, por sua vez, foram calculados quanto à presença de sítios de implantação com aparência hemorrágica e coloração marrom.

4.4. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada nas amostras de cornos uterinos, fígado e baço do grupo I, e placenta e tecido fetais do grupo II. Para isso, as amostras foram maceradas utilizando a técnica de congelamento com auxílio do nitrogênio líquido e o peso foi normalizado para 20 mg para cada amostra. Em seguida, foi extraído o DNA utilizando o kit de purificação de DNA (Promega, São Paulo, SP, Brasil) e a quantidade de DNA foi mensurada por absorbâncias no NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda 260 e 280 nm. A pureza do DNA presente nas amostras foi determinada pela razão entre as leituras em densidade óptica 260/280 nm. Amostras que apresentaram uma razão entre 1,8 e 2,0 foram consideradas satisfatórias para o prosseguimento das análises. A quantidade de DNA por amostra foi ajustada para

uma concentração de 40 ng/ μ L para a detecção de *T. gondii* e 1ng/ μ L para o gene GAPDH.

4.5. Reação de PCR em tempo real para quantificação parasitária

A concentração de DNA de *T. gondii* no fígado, baço e cornos uterinos gravídicos de fêmeas do grupo I, e placentas e fetos das fêmeas pertencentes ao grupo II foi determinada por qPCR em tempo real. Os ensaios para quantificar a carga parasitária nos respectivos tecidos foram realizados na máquina de PCR em tempo real StepOnePlus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e usando o kit Master Mix Go Taq® (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* utilizados para amplificação do DNA correspondente ao gene 529 de *T. gondii* (amplicon 50pb) foram: *forward*, 5'-GCTCCTCCAGCCGTCTTG-3', e *reverse*, 5'-TCCTCACCTCGCCTTCAT-3'. Os dados foram analisados usando o software *Data Analysis and Technical Graphics* (Origin version 6.0; Microcal Software, Inc., Northampton, MA). O valor obtido para cada amostra fora calculado de acordo com a curva padrão (100ng de DNA) contendo seis pontos de diluição e por fim, normalizados de acordo com o gene de referência do gene GAPDH.

4.6. Detecção de citocinas (CBA)

O soro das fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT foi coletado, e as amostras pertencentes ao grupo I, II, V e VI foram analisadas quanto ao perfil de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IFN- γ e TNF- α) usando um kit CBA (BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo BDTM (FACSCalibur, BD Company, San Diego, CA, Estados Unidos). E por fim os dados foram expressos em pg/mL.

4.7. Análise estatística

Todos os dados foram analisados como média e erro padrão usando o programa *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste Two-Way ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni, e as comparações entre condições pares foram realizadas pelo teste *t* de Student em casos paramétricos ou pelo teste de Mann-Whitney, quando os dados foram

não paramétricos. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4.8. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos e manuseio do material biológico, dos reagentes, utilização dos equipamentos bem como conduta com os animais serão realizadas de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

5. RESULTADOS

5.1. Camundongos ICAM-1^{-/-} e WT apresentaram variações nas taxas de reabsorção e números de sítios de implantação dependendo do tempo de infecção e gestação

O grupo I consistiu em fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT que foram infectadas no primeiro dia de gestação, ou seja, no dia em que foi verificado a rolha vaginal, e eutanasiadas no 8º dia de gestação/8º dia de infecção (8dg/8di). Já o grupo V foi composto por fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT eutanasiadas no 8º dia de gestação sem infecção (8dg/ni). Avaliamos nesse grupo diversos parâmetros como taxa de sobrevivência, número de fêmeas com fetos reabsorvidos, a porcentagem de implantação e de reabsorção. Os resultados mostraram que as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT (8dg/8di e 8dg/ni) pertencentes aos grupos I e V apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100% (Tabela I). Em contraste, um maior número de fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas (8dg/8di) tiveram fetos reabsorvidos (66%) se comparado com as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT (8dg/ni) (16,6%) e WT (8dg/8di) (0%) (Tabela I). Fêmeas ICAM-1^{-/-} (8dg/8di) apresentaram uma menor porcentagem de sítios de implantação (37%) e um aumento da taxa de perda embrionária (63%), quando comparados às fêmeas ICAM-1^{-/-} (8dg/ni) (95,7% e 4,3%), WT infectadas (100% e 0%), e WT não infectadas (95% e 5%) (Tabela I). Os resultados ainda demonstraram que a infecção por *T. gondii* nas fêmeas WT não alterou de forma significativa a taxa de perda embrionária e os sítios de implantação quando comparado às fêmeas WT não infectadas (Tabela I), mostrando que a infecção com *T. gondii* no início de gestação comprometeu drasticamente o sucesso gestacional nas fêmeas ICAM-1^{-/-}, mas não nas fêmeas WT. Nas imagens representativas é possível visualizar os cornos uterinos gravídicos de fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas com embriões completamente reabsorvidos, visto que o tecido mostrou-se mais vascularizado, e com pontos de reabsorção, identificados por coágulos sanguíneos (Figura 2A). Fêmeas ICAM-1^{-/-} não infectadas apresentaram cornos uterinos com embriões em formação e nenhum ponto de reabsorção (Figura 2B). Nas figuras 2C e 2D é possível verificar cornos uterinos gravídicos de fêmeas WT infectadas e não infectadas, respectivamente, indicando que nas duas condições os embriões estavam em formação e não foi verificado pontos de reabsorção.

Quando os grupos II e VI foram analisados, observamos que ambas as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT, em ambas as condições, infectadas (14dg/7di) e não infectadas (14dg/ni) apresentaram 100% de sobrevivência (Tabela II). Além disso, 66,6% das fêmeas ICAM-1^{-/-} (14dg/7di) possuíam sítios de reabsorções, enquanto que os grupos contendo fêmeas

ICAM-1^{-/-} e WT (14dg/ni), e WT (14dg/7di) apresentaram 33,3% e 16% das fêmeas com sítios de reabsorção, respectivamente (Tabela II). Fêmeas ICAM-1^{-/-} (14dg/7di) apresentaram uma menor porcentagem de sítios de implantação (88%) e um aumento da taxa de perda embrionária (12%), quando comparados às fêmeas ICAM-1^{-/-} (92,5% e 7,5%) e WT (14dg/ni) (90,5% e 9,5%), e WT infectadas (91% e 9%) (Tabela II). Nossos dados mostraram que a infecção com *T. gondii* resultou em um leve aumento na taxa de perda embrionárias nos animais ICAM-1^{-/-} em relação aos animais WT, enquanto que a infecção no início do terço médio da gestação ocasionou menor porcentagem de perdas embrionárias nos animais deficientes para ICAM-1 se comparado com a infecção no terço inicial da gestação. A imagem representativa dos cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas mostram fetos em formação com as respectivas placentas e alguns pontos de reabsorção identificados por coágulos sanguíneos (Figura 3A). Já os cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} não infectadas são mostrados na figura 3B. Os cornos uterinos de fêmeas WT não infectadas e infectadas são mostrados nas figuras 3C e 3D, respectivamente.

Analisando os grupos contendo fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT (19dg/12di), foi observado que houve 100% de sobrevivência, com exceção do grupo composto por fêmeas WT 19dg/12di que apresentou 83% de taxa de sobrevivência (Tabela III). Nos grupos infectados, 66,6% das fêmeas ICAM-1^{-/-} e 60% das fêmeas WT apresentaram sítios de reabsorção. Já, nos grupos não infectados, 83,3% das fêmeas, ICAM-1^{-/-}, e 66,6% das fêmeas WT apresentaram sítios de reabsorção (Tabela III). Os dados ainda mostraram que a infecção por *T. gondii* no 8º dia de gestação não afetou negativamente o sucesso da gestação nesses animais, pois as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas (19dg/12di) apresentaram números de sítios de implantação e taxa de perda embrionária muito semelhantes aos do grupo controle (19dg/ni) (Tabela III). Fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas e não infectadas tiveram 86,5% e 86,7% de sítios de implantação e 13,5% e 13,3% de taxa de perda embrionária, respectivamente (Tabela III). Já as fêmeas WT infectadas e não infectadas apresentaram 92,5% e 89,7% de sítios de implantação e 7,5% e 10,3% de taxa de perda embrionária, respectivamente (Tabela III).

Quando a infecção ocorreu mais tardiamente, foi observado que 66,6% das fêmeas dos grupos ICAM-1^{-/-} (19dg/8di) e 50% das fêmeas dos grupos WT (19dg/8di) apresentaram sítios de implantação. Foi visto também que houve uma diminuição no número de sítios de implantação tanto nas fêmeas ICAM-1^{-/-} (60%), quanto nas fêmeas WT (73,8%) (Tabela IV). Conseqüentemente, houve uma maior taxa de perda

embrionária, 40% nas fêmeas ICAM-1^{-/-} e 26,2% nas fêmeas WT (Tabela IV). Assim, nossos dados mostraram que a infecção por *T. gondii* no final do terço médio da gestação foi extremamente prejudicial para o sucesso gestacional tanto para as fêmeas ICAM-1^{-/-} quanto para as fêmeas WT, entretanto, as fêmeas deficientes para ICAM-1 apresentaram uma maior perda embrionária quando comparado às fêmeas WT. A figura 4A mostra cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas (19dg/12di) com alguns pontos de reabsorção. A figura 4B mostra os cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas no final do terço médio de gestação com vários pontos de reabsorção. Já na figura 4C, nós visualizamos cornos uterinos de fêmeas não infectadas, com a presença de fetos formados e placenta desenvolvida. As imagens representativas de cornos uterinos de fêmeas WT infectadas mostram fetos e placenta (Figura 4D). A figura 4E mostra cornos uterinos com alta taxa de reabsorção, e a figura 4F mostra cornos uterinos com fetos e placentas formados em fêmeas não infectadas.

5.2. Fêmeas ICAM-1^{-/-} (8dg/8di) apresentaram maior taxa de infecção por *T. gondii* no corno uterino gravídico

Para quantificar a taxa de infecção de *T. gondii* no corno uterino gravídico, baço e fígado das fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas no 1º dia de gestação e eutanasiadas no 8º dia de gestação (8dg/8di), foi realizado a técnica de qPCR em tempo real. Os resultados encontrados mostraram que nos animais ICAM-1^{-/-} houve uma maior taxa de infecção por *T. gondii* no corno uterino gravídico em relação aos animais WT ($P = 0,0458$) (Figura 5A). Por outro lado, não houve diferença significativa na taxa de infecção por *T. gondii* nos órgãos maternos avaliados, como baço e fígado entre as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT (Figura 5B-C). Esses dados indicam que a ausência de ICAM-1 favoreceu o maior número de *T. gondii* no corno uterino gravídico de fêmeas infectadas no início da gestação. Análise por qPCR ainda precisa ser realizada para a quantificação de *T. gondii* em outros órgãos maternos.

5.3. Fêmeas ICAM-1^{-/-} (14dg/7di) apresentaram maior taxa de infecção por *T. gondii* na placenta

Após avaliarmos a taxa de infecção nos animais com 8dg/8di, foi mensurado a carga parasitária de *T. gondii* na placenta e tecidos fetais provenientes de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas no 8º dia de gestação e eutanasiadas no 14º dia de gestação (14dg/7di) com o objetivo de avaliar a taxa de transmissão vertical de *T. gondii* quando a infecção

ocorreu no início do terço médio da gestação. Nossos dados apontam que fêmeas ICAM-1^{-/-} apresentaram maior taxa de infecção por *T. gondii* na placenta se comparado com as fêmeas WT ($P = 0,0286$) (Figura 6A). Porém nos tecidos fetais não houve diferença na taxa de infecção pelo parasito. Assim, sugerimos que a infecção no terço médio da gestação resultou em uma maior taxa de infecção na placenta em animais deficientes para ICAM-1 quando comparados aos animais WT.

5.4. IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 são modulados pela infecção por *T. gondii* dependendo do tempo gestacional

O soro das fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas (8dg/8di e 14dg/7di) e das fêmeas controles, não infectadas (8dg/ni e 14dg/ni) foram coletados e analisados por CBA para quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como, IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-17, IL-10, IL-4 e IL-2. Os dados mostraram que nas fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT controles (8dg/ni) a secreção de IFN- γ foi muito baixa, porém, houve um aumento significativo na produção de IFN- γ após a infecção por *T. gondii* tanto nas fêmeas ICAM-1^{-/-} ($P < 0,0001$), quanto nas fêmeas WT ($P = 0,0011$) quando comparado com os respectivos controles (Figura 7A). Já nas fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT com 14 dias de gestação não infectadas (14dg/ni) houve uma alta produção desta citocina em ambas as fêmeas, porém, animais ICAM-1^{-/-} não infectados apresentaram maior secreção de IFN- γ , quando comparadas com as fêmeas WT ($P = 0,0244$) (Figura 7B). Além do mais, observamos uma tendência na diminuição da produção de IFN- γ em ambas as fêmeas (14dg/7di) após a infecção com *T. gondii*, havendo uma diminuição significativa dessa citocina apenas nas fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas quando comparadas com as fêmeas não infectadas ($P = 0,0079$) (Figura 7B).

Para IL-6, os dados demonstraram que ambas as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT (8dg/ni) produziram baixos níveis de IL-6, e não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos (Figura 7C). Entretanto, após a infecção com o parasito, foi observado um aumento significativo na produção de IL-6, tanto nas fêmeas ICAM-1^{-/-}, quanto WT ($P = 0,0106$; $P = 0,0033$, respectivamente) (Figura 7C). Quando analisamos o perfil de IL-6 nos animais ICAM-1^{-/-} e WT (14dg/ni) observamos que estes secretaram níveis mais altos de IL-6 (Figura 7D), e não houve diferenças estatísticas entre as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT. Contudo, quando as fêmeas foram infectadas com *T. gondii* no 8º dia de gestação e eutanasiadas no 14º dia foi observado uma redução significativa na secreção de IL-6 em ambas as fêmeas ICAM-1^{-/-} ($P = 0,0330$) e WT ($P = 0,0142$) (Figura 7D). Não houve

diferença na produção de IL-6 entre as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT (14dg/7di) (Figura 7D). Estes dados mostram que os níveis basais de IL-6 no terço inicial da gestação em camundongos ICAM-1^{-/-} e WT foi baixo, mas foi modulado positivamente com a infecção. Em contraste, no terço médio da gestação, houve uma alta produção de IL-6 em fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT não infectadas, e após a infecção, ocorreu um decréscimo na secreção dessa citocina.

Assim como IFN- γ e IL-6, a citocina pró-inflamatória TNF- α também apresentou baixos níveis nas fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT com 8 dias de gestação e não infectadas (8dg/ni) (Figura 7E) e após a infecção houve um aumento significativo da produção de TNF- α nas fêmeas ICAM-1^{-/-} ($P = 0,0020$) e WT ($P = 0,0002$), quando comparadas com os respectivos controles não infectados (Figura 7E). Porém quando avaliado a liberação de TNF- α no terço médio da gestação, não houve diferenças estatísticas entre os grupos controles ICAM-1^{-/-} e WT em relação às fêmeas infectadas (Figura 7F).

IL-17 foi avaliada em todos os grupos e não houve diferenças significativas na produção desta citocina nas fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT com 8 ou 14 dias de gestação, infectadas ou não por *T. gondii* (Figura 7G e 7H).

Além dessas citocinas, avaliamos perfil de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Observamos que nas fêmeas com 8 dias de gestação, os níveis basais de IL-10 foram extremamente baixos tanto nos animais ICAM-1^{-/-} quanto WT, e não houve diferenças entre os grupos (Figura 7I). Entretanto, após a infecção ocorreu um aumento significativo na produção de IL-10 nas fêmeas ICAM-1^{-/-} ($P = 0,0029$) e WT ($P = 0,0127$), quando comparadas com os respectivos controles (Figura 7I). No entanto, quando foi avaliado a produção desta citocina no terço médio da gestação, não houve diferenças estatísticas na liberação de IL-10 entre as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas ou não por *T. gondii* (Figura 7J).

As citocinas IL-2 e IL-4 foram mensuradas em todos os grupos experimentais, ICAM-1^{-/-} e WT 8dg/ni e 8dg/8di, e 14dg/ni e 14dg/7di, mas não foram detectadas em nenhuma das condições descritas.

6. DISCUSSÃO

ICAM-1 é uma glicoproteína de superfície celular induzível, membro da família de uma grande classe de imunoglobulinas transmembrânicas. Esta molécula é normalmente expressa em níveis baixos no endotélio vascular, linfócitos e macrófagos (GAFFURI et al., 1998; BENEDICTO; ROMAYOR; ARTETA, 2017; YU; SHANG; JIANG, 2020), porém em resposta à infecção, é observado um aumento da expressão de ICAM-1 na superfície celular de vários tipos celulares o que resulta no aumento das interações adesivas celulares (ZHAO et al., 2017). Esse mecanismo facilita a migração transendotelial de leucócitos para a região afetada e a eliminação de patógenos (RAMOS; BULLARD; BARNUM, 2014; ZHAO et al., 2017). Porém, alguns estudos sugerem que o aumento da expressão de ICAM-1 pode influenciar e facilitar a transferência de patógenos, incluindo *T. gondii*, através da barreira placentária (ARIAS; MUÑOZ; MUÑOZ-FERNANDES, 2003, ROBBINS et al., 2012). Dessa maneira, o presente trabalho avaliou se a ausência de ICAM-1 em camundongos da linhagem C57BL/6 diminuiria a transmissão vertical de *T. gondii*.

Interessantemente, nossos dados mostraram que nos grupos ICAM-1^{-/-} 8dg/8di e 19dg/8di houve maior reabsorção de embriões e fetos, respectivamente, quando comparados com os referentes controles ICAM-1^{-/-} não infectados e WT nas mesmas condições experimentais. Esses resultados indicam que a infecção por *T. gondii* no terço inicial e no final do terço médio da gestação nos animais ICAM-1^{-/-} foram extremamente prejudiciais para a gestação. Além da avaliação do sucesso gestacional em fêmeas 8dg/8di e 19dg/8di, foi avaliado o efeito da infecção por *T. gondii* no início do terço médio da gestação e eutanasiadas com 14 e 19 dias de gestação (14dg/7di e 19dg/12di, respectivamente). Os resultados encontrados nos grupos 14dg/7di e 19dg/12di mostraram um sutil aumento da taxa de perda embrionária nos animais ICAM-1^{-/-}, mas não houve uma diferença tão expressiva quando comparados aos grupos ICAM-1^{-/-} 8dg/8di e 19dg/8di. Diante dos nossos dados, vimos uma grande variação na taxa de aborto entre os grupos com diferentes períodos de infecção com *T. gondii*. O fato de ter encontrado maior parasitismo no corno uterino gravídico e na placenta de fêmeas ICAM-1^{-/-} 8dg/8di e 14dg/7di, respectivamente, pode justificar a maior taxa de perda embrionária nessas fêmeas e a dosagem de citocina nesses locais podem auxiliar a responder essa questão. Porém, alguns estudos utilizando camundongos evidenciaram que as taxas de reabsorção fetal no início da gestação podem ocorrer por outros mecanismos que não diretamente a proliferação de *T. gondii* no tecido uterino (SHIONO et al., 2007; GE et al., 2008).

Estudos apontaram que a infecção por *T. gondii* diminuiu drasticamente a expressão de células Treg, resultando em prejuízos à gestação (ZHANG et al., 2019). Chen e colaboradores (2013) mostraram que fêmeas C57BL/6 prenhes que foram desafiadas com antígenos de *T. gondii* no 5º e 10º de gestação tiveram maior taxa de perda fetal se comparado com fêmeas que foram desafiadas com o antígeno no 15º dia de gestação. Além do mais, os autores sugeriram que estes resultados estariam relacionados com a diminuição do número e função supressora de células Treg após a injeção com antígenos do parasito nos estágios iniciais e intermediários da gestação em camundongos (CHEN et al., 2013). No nosso trabalho foi observado que nos animais WT não houve diferenças significativas na taxa de perda embrionária entre os grupos infectados e não infectados quando a infecção ocorreu no 1º e 8º dia de gestação, porém, houve uma maior perda embrionária quando a infecção se deu no 12º dia de gestação. Apesar da discordância com os dados da literatura é importante ressaltar, que as vias de inóculo foram diferentes, uma vez que no nosso trabalho foi utilizado cistos do parasito para a infecção, enquanto que nesse estudo foi usado antígenos de *T. gondii*. Além do mais, os dias de infecção e eutanásia das fêmeas prenhes também foram diferentes.

Embora nossos resultados com fêmeas WT apresentem divergências referentes ao que foi visto por Chen e colaboradores (2013), a diferença em relação ao sucesso gestacional entre as fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT não descarta a possibilidade de um desequilíbrio da resposta imunológica em decorrência de um decréscimo diferencial de células Treg entre os dois *backgrounds* após a infecção. Estudos mostraram que animais deficientes para ICAM-1 possuem menor número de células Treg na periferia quando comparados aos animais WT (SAKAGUCHI, 2004; WINDISH et al., 2009). Ademais, foi verificado que ICAM-1 é requerido para a indução de células T reg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos tecidos. A resposta reduzida à sinalização de TGF-β1 em células T CD4⁺ em animais deficientes para ICAM-1 resultou em expressão prejudicada de Foxp3 e uma redução subsequente em células Treg nos tecidos de camundongos ICAM-1^{-/-} (WINDISH et al., 2009). Ainda foi demonstrado que os animais ICAM-1^{-/-} apresentaram uma diminuição mais acentuada de células Treg durante uma resposta inflamatória pela infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, contribuindo para o aumento da inflamação e patologia e pior resultado clínico após a infecção por *M. tuberculosis* nesses animais (WINDISH et al., 2009).

Se avaliamos os dados preliminares do perfil de citocinas nos grupos ICAM-1^{-/-} e WT (8dg/8di), observamos alta produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ e

IL-6 e TNF- α após a infecção com *T. gondii*. Embora não tenha sido identificado diferenças significativas na produção destas citocinas entre fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT, nossos dados mostraram que houve maior taxa de perda embrionária nos animais ICAM-1^{-/-}. Assim, sugerimos que o aumento de citocinas pró-inflamatórias após a infecção por *T. gondii* nos animais ICAM-1^{-/-} pode ser mais danoso à gestação do que nos animais WT, possivelmente, devido a uma menor regulação da resposta inflamatória resultado da diminuição de células Treg em animais deficientes para ICAM-1. A análise de citocinas nos grupos em que a infecção ocorreu no final do terço médio da gestação (19dg/8di) ainda não foram concluídas, porém acreditamos que nesse período também ocorra um desequilíbrio da resposta imunológica, desfavorecendo a gestação e aumentando as taxas de abortos nos dois grupos, sendo mais drástico nos animais deficientes para ICAM-1.

Em adição, o perfil de citocinas no grupo 14dg/7di mostrou uma diminuição significativa na produção de IL-6 após a infecção, tanto nas fêmeas ICAM-1^{-/-}, quanto nas fêmeas WT. Já as citocinas IFN- γ e TNF- α apresentaram apenas uma tendência à redução da secreção após a infecção pelo parasito. Porém, quando comparado as fêmeas ICAM-1^{-/-} infectadas em relação grupo controle não infectado, houve uma diminuição significativa na secreção de IFN- γ . Esses resultados podem justificar o maior sucesso gestacional nos dois grupos analisados, principalmente nas fêmeas ICAM-1^{-/-}. Assim, sugerimos que a diminuição significativa de IL-6 e IFN- γ pode ter gerado uma maior tolerância imunológica nas fêmeas ICAM-1^{-/-} prenhes e infectadas no início do terço médio da gestação, restabelecendo um maior equilíbrio na resposta imunológica em relação a deficiência na produção de células Treg observadas em trabalhos anteriores (SAKAGUCHI, 2004; WINDISH et al., 2009). Provavelmente esse perfil mais tolerogênico tenha sido suficiente para controlar uma resposta exacerbada desencadeada pela infecção por *T. gondii*, resultando em maior sucesso gestacional.

É sabido que durante a maior parte do período de gestação ocorre um delicado equilíbrio das citocinas Th1/Th2, e células Treg prevalecem para promover o crescimento fetal e inibir a alorrejeição pela resposta imune materna (SAITO et al., 2010). Além disso, células Treg regulam respostas imunes inflamatórias locais, potencialmente prejudiciais ao feto (SAKAGUCHI, 2004; SAITO et al., 2013; WANG et al., 2020). Com a infecção por algum patógeno como *T. gondii* há um predomínio de uma resposta Th1 que é protetora, induzida com o objetivo de eliminar o parasito. Esse desequilíbrio na resposta imunológica pode ocasionar diversos problemas na gestação ou até mesmo o aborto (LUPPI, 2003). Possivelmente, animais ICAM-1^{-/-} possuem um maior desequilíbrio na

resposta imune reguladora após a infecção por *T. gondii* se comparado com os animais WT.

No presente trabalho mensuramos o parasitismo para avaliar o papel de ICAM-1 na transmissão transplacentária de *T. gondii*. Os dados preliminares mostraram que os animais ICAM-1^{-/-} foram mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* se comparado com os animais WT, pois foi encontrado maior número de parasitos no corno uterino gravídico e placentas de fêmeas deficientes para ICAM-1. Ademais, nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas na taxa de parasitismo nos tecidos fetais da prole de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT. Esse resultado pode estar associado ao curto tempo de exposição à infecção em que os animais foram submetidos, fazendo-se necessário a análise da carga parasitária nos tecidos fetais da prole de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT submetidas a um maior tempo de infecção.

Estudos anteriores correlacionam a presença de patógenos, incluindo *T. gondii* e o produção de citocinas pró-inflamatórias como fatores para o aumento da expressão de ICAM-1 na superfície das células trofoblásticas (MAUBERT; GUILBERT; DELORON, 1997) e ao mesmo tempo pode levar a um aumento da infecção do tecido placentário (JULIANO; BLOTTA; ALTERMANI, 2006). Além do mais, estudos mostraram que moléculas adesivas MIC2 de *T. gondii* se ligam a ICAM-1 permitindo a migração do parasito para diversos tecidos do organismo, incluindo a placenta (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005).

Nesse sentido, esperávamos que animais deficientes para ICAM-1 apresentassem menor parasitismo se comparado aos animais WT. Porém muitos estudos da literatura também relataram a importância de ICAM-1 na regulação da resposta imunológica através do recrutamento de células imunológicas para sítios de infecção e o estabelecimento de sinapses imunológicas. De Paula e colaboradores (2017) mostraram que animais deficientes para ICAM-1 tiveram maior taxa de infecção bacteriana pela infecção com *Mycobacterium avium* no fígado, pulmão e baço quando comparados com animais WT. Esses dados podem ser justificados em decorrência de uma diminuição no recrutamento de células CD3⁺NK1⁺, linfócitos e granulócitos para os sítios de infecção e consequente diminuição de IFN- γ . Adicionalmente, estudos mostraram que durante a infecção por *Chlamydia trachomatis* a ausência de ICAM-1 em camundongos prejudicou a ativação de células Th1 específicas, bem o recrutamento de células imunes para a mucosa genital, levando a um aumento da infecção por essa bactéria (IGIETSEME et al., 1999). Camundongos ICAM-1^{-/-} quando tratados com zymosan para indução de uma

resposta inflamatória apresentaram menor extravasamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal quando comparado com os animais sem esse *background*, resultando em menor capacidade de responder a inflamação (HE et al., 2014). Por fim, outro estudo mostrou que camundongos ICAM-1^{-/-} foram mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi*, apresentando maior taxa de mortalidade, parasitemia e parasitismo no tecido cardíaco. Ademais, o aumento do parasitismo foi associado ao decréscimo da migração de células TCD4⁺ e TCD8⁺ no tecido cardíaco (MICHAILOWSKY et al., 2014). Todos esses dados reafirmam o papel crucial de ICAM-1 na montagem de uma resposta imunológica eficiente para o controle de uma infecção. Assim, sugerimos que, embora *T. gondii* utilize ICAM-1 para migrar pelos tecidos no organismo, a ausência dessa molécula não foi capaz de controlar o parasitismo no corno uterino gravídico e na placenta, possivelmente porque a resposta imunológica nesses animais é diminuída levando a uma menor migração de linfócitos e granulócitos para os sítios de infecção para controlar o parasitismo.

Dessa maneira, acredita-se que com uma resposta imunológica menos eficiente nos animais *knockouts* para ICAM-1, os parasitos se multipliquem mais rapidamente, e migrem mais facilmente para os tecidos, incluindo o corno uterino gravídico e placenta. Para avaliar a taxa de transmissão transplacentária entre os dois *backgrounds* será necessário avaliar o parasitismo em tecidos fetais nos grupos 19dg/12di, pois estes apresentam maior tempo de infecção, o suficiente para ocorrer a passagem transplacentária do parasito até os tecidos fetais. Além disso, também será avaliado o perfil de citocinas produzidas localmente nos cornos uterinos gravídicos e placentas das fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT a fim de entender o papel das citocinas no microambiente da interface materno-fetal e o papel de ICAM-1 na transmissão do parasito. E por fim, também deverá ser analisado a migração de células imunológicas para sítios de infecção em diversos órgãos maternos.

7. CONCLUSÕES

- A infecção por *T. gondii* nos animais ICAM-1^{-/-} no início do terço inicial (8dg/8di) comprometeu drasticamente o sucesso gestacional quando comparado com os animais WT.
- A infecção no início do terço médio (14dg/7di) da gestação ocasionou menor porcentagem de perda embrionária nos animais ICAM-1^{-/-} quando comparados com a infecção no início da gestação (8dg/8di) e no final do terço médio (19dg/8di) de gestação.
- Quando a infecção ocorreu no final do terço médio (19dg/8di), ambas os grupos experimentais tiveram aumento na taxa de perda embrionária, porém, foi expressivo nos animais ICAM-1^{-/-}.
- Fêmeas ICAM-1^{-/-} 8dg/8di apresentaram maior parasitismo no corno uterino gravídico quando comparado aos animais WT.
- Fêmeas ICAM-1^{-/-} 14dg/7di tiveram maior taxa de infecção por *T. gondii* na placenta em relação aos animais WT, porém não foi visto diferenças nos tecidos fetais.
- Animais ICAM-1^{-/-} e WT 8dg/8di apresentaram aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e TNF- α em relação aos respectivos controles não infectados.
- Fêmeas 14dg/7di apresentaram uma diminuição significativa na produção de IL-6 após a infecção.
- A produção de IFN- γ foi significativamente menor apenas em fêmeas ICAM-1^{-/-} após a infecção, mas apresentou uma tendência de redução nos animais WT.
- A secreção de TNF- α nos animais 14dg/7di apresentou uma tendência à redução, porém não foi significativa em relação aos grupos não infectados.
- IL-10 foi significativamente aumentado em fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT 8dg/8di em relação aos controles não infectados, porém não houve diferenças entre os grupos 14dg/7di e 14dg/ni.
- A ausência de ICAM-1 não foi capaz de controlar o parasitismo.

FIGURAS

Figura 1

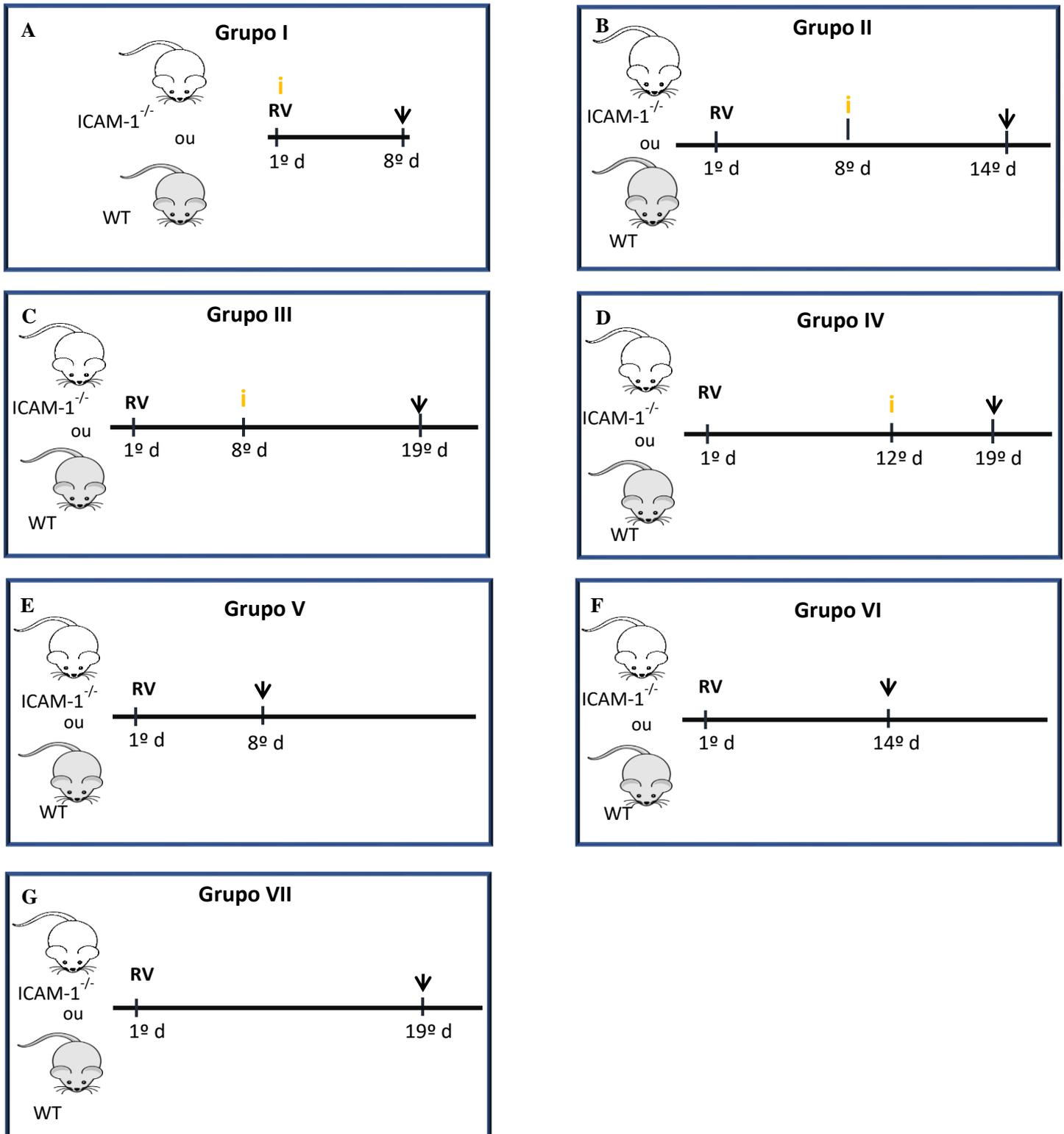


Figura 1: Esquema representativo dos diferentes grupos de animais ICAM-1^{-/-} e WT infectados e não infectados. (A) O grupo I representa fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas com 5 cistos de *T. gondii* (ME-49) por via oral no dia da detecção da rolha vaginal (RV) e eutanasiadas no 8º dia de gestação; (B) grupo II é compreendido por fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas no 8º dia gestação e eutanasiadas no 14º dia gestação; (C) grupo III é composto por fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT infectadas no 8º dia de gestação e eutanasiadas no 19º dia de gestação; (D) grupo IV formado por fêmeas infectadas no 12º dia de gestação e eutanasiadas no 19º dia de gestação. (E-G) os grupos V, VI e VII compreende fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT controle não infectadas e eutanasiadas nos dias 8º, 14º e 19º dia de gestação, respectivamente. Cada grupo foi composto por um n=6 para cada *background* genético.

Figura 2

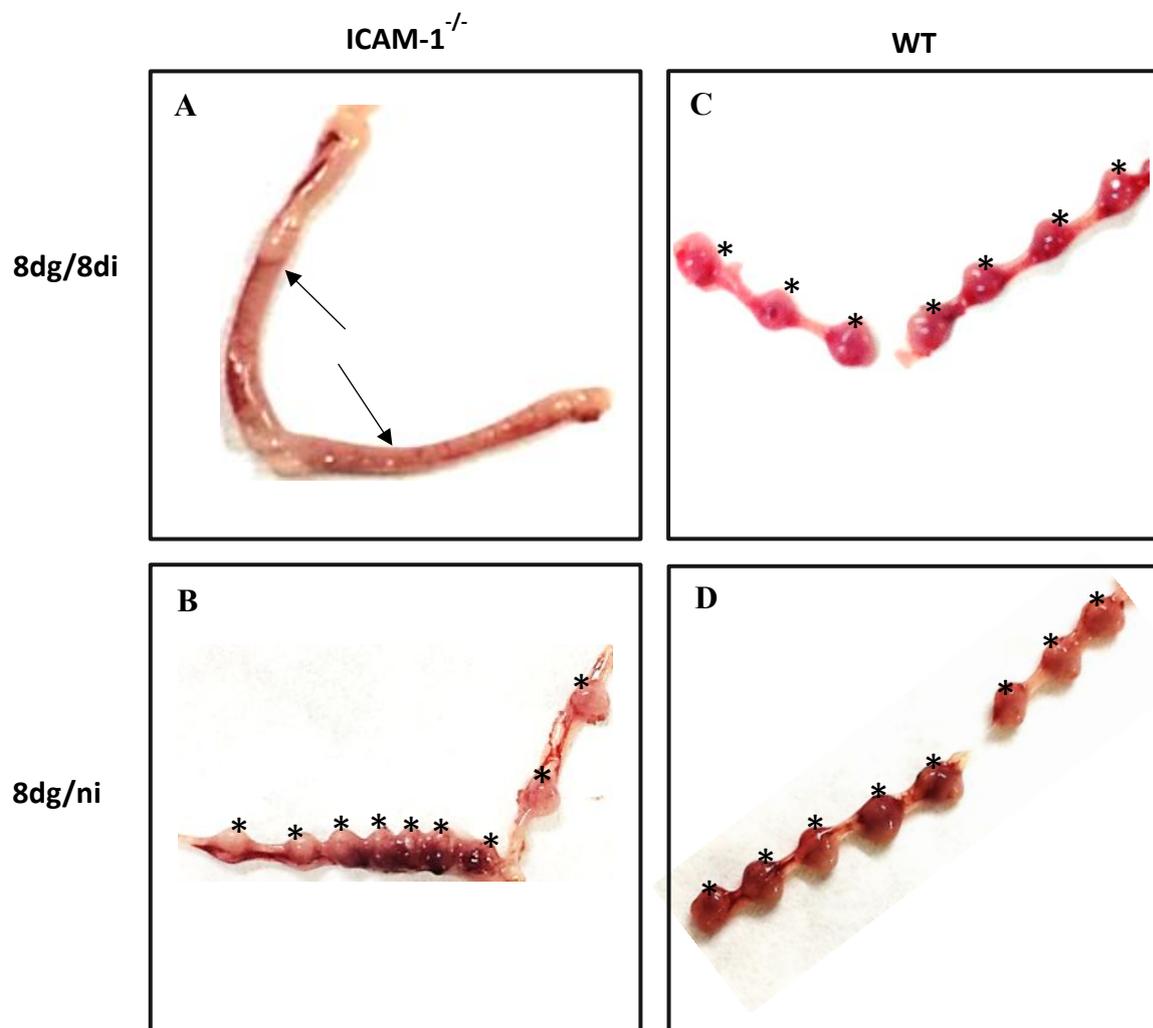


Figura 2: Imagens representativas de cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT no terço inicial da gestação. Fotos representativas evidenciam os cornos uterinos de fêmeas (A) ICAM-1^{-/-} 8dg/8di; (B) ICAM-1^{-/-} 8dg/ni; (C) WT 8dg/8di e (D) WT 8dg/ni. Setas indicam cornos uterinos muito vascularizados e com completa reabsorção dos embriões. Asteriscos evidenciam embriões em formação.

Figura 3

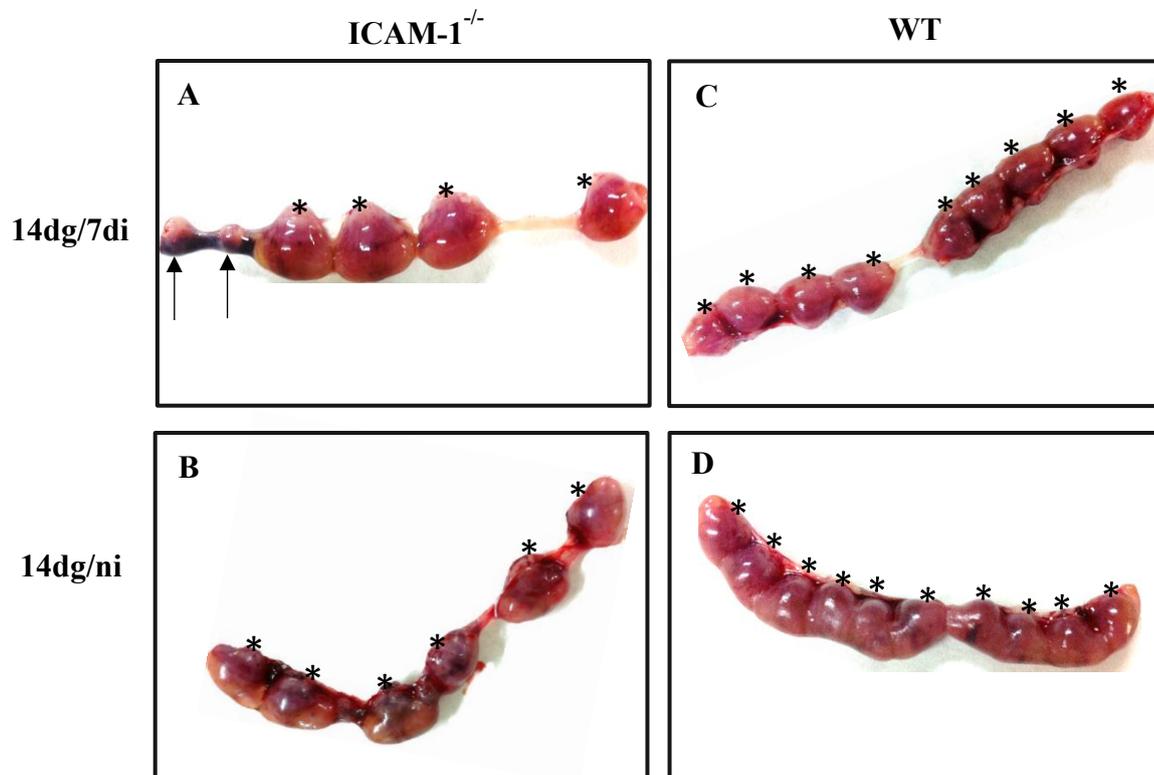


Figura 3: Imagens representativas de cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT no terço médio da gestação. Fotos representativas evidenciam os cornos uterinos de fêmeas (A) ICAM-1^{-/-} 14dg/7di; (B) ICAM-1^{-/-} 14dg/ni; (C) WT 14dg/7di e (D) WT 14dg/ni. Setas indicam os sítios de reabsorção com aparência hemorrágica e coloração marrom. Asteriscos mostram os embriões e placentas em formação.

Figura 4

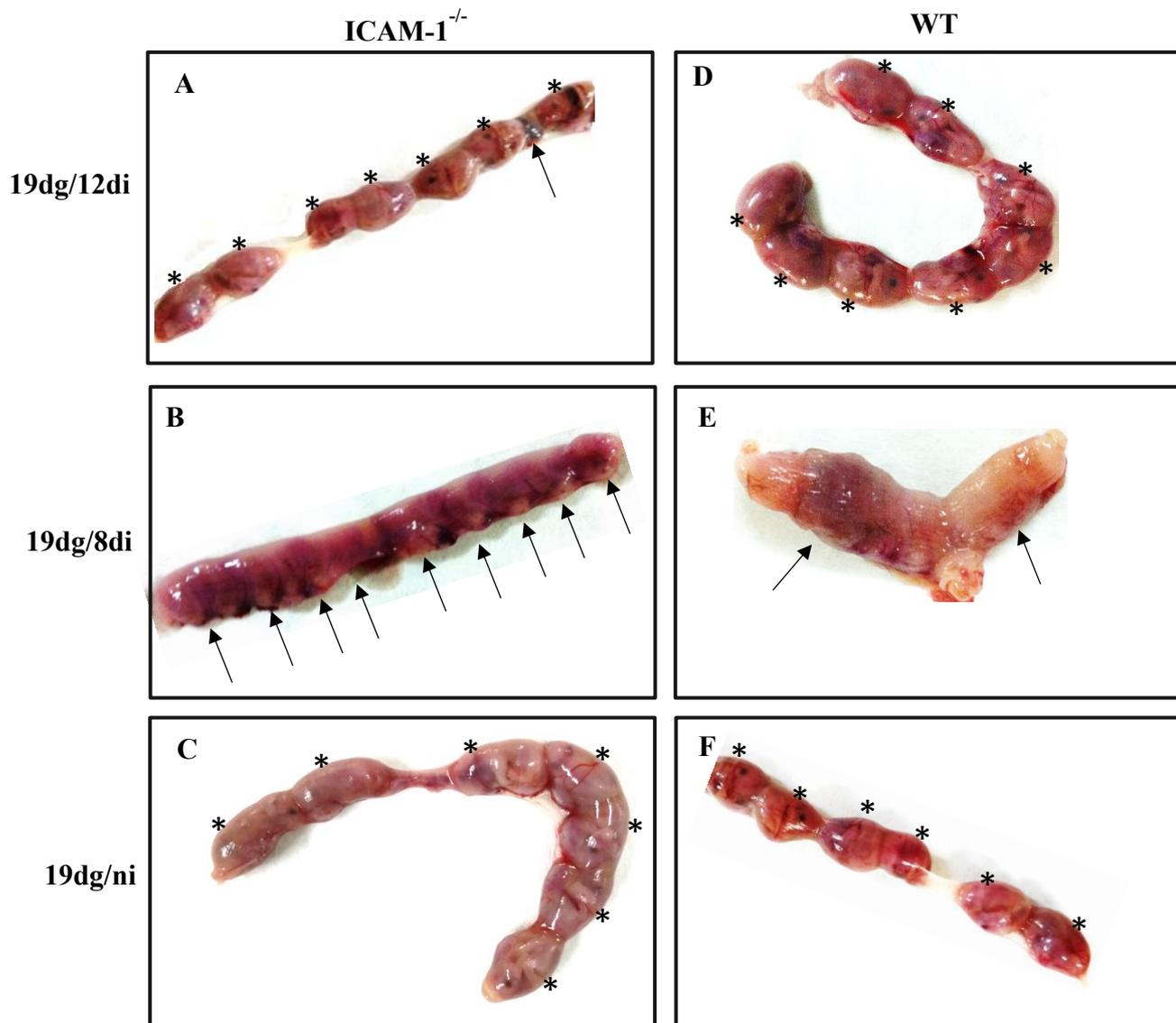


Figura 4: Imagens representativas de cornos uterinos de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT no terço final da gestação. Fotos representativas evidenciam os cornos uterinos de fêmeas (A) ICAM-1^{-/-} 19dg/12di; (B) ICAM-1^{-/-} 19dg/8di; (C) ICAM-1^{-/-} 19dg/ni; (D) WT 19dg/12di; (E) WT 19dg/8di; (F) WT 19dg/ni. Setas indicam os sítios de reabsorção com aparência hemorrágica e coloração marrom. Asteriscos mostram os fetos e placentas.

Figura 5

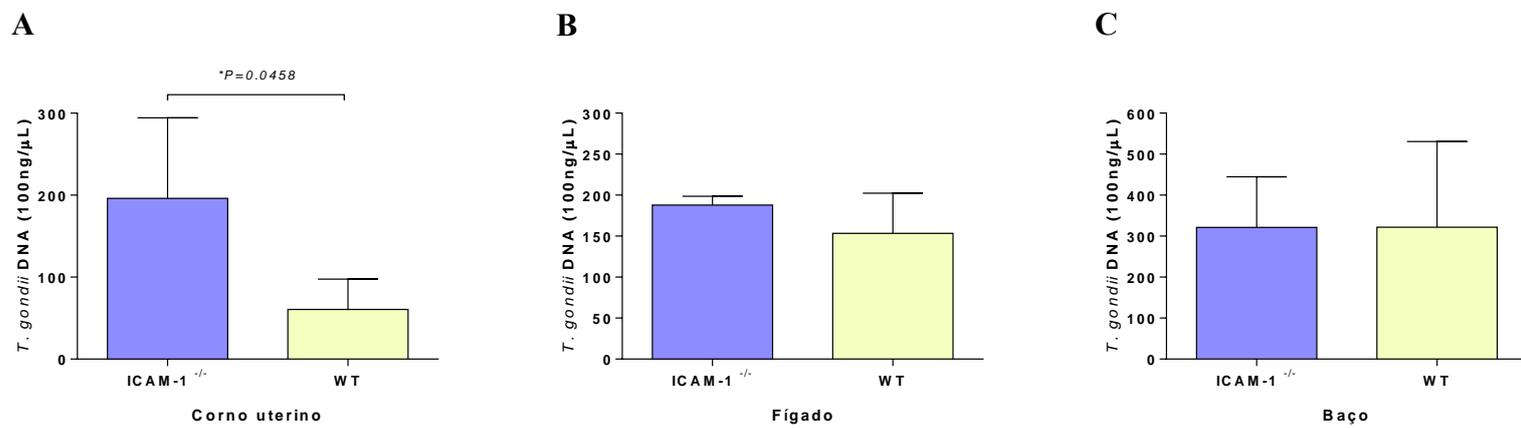


Figura 5: Carga parasitária em órgãos maternos em fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT 8dg/8di. Fêmeas ICAM-1^{-/-} (n=6) e WT (n=6) foram infectadas com 5 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) no dia da detecção da rolha vaginal e foram eutanasiadas no 8º dia gestação/8º dia de infecção (8dg/8di). Os órgãos maternos foram coletados para a análise por qPCR. A carga parasitária foi mensurada no (A) corno uterino gravídico, (B) fígado e (C) baço. Diferenças estatísticas entre os grupos ICAM-1^{-/-} e WT foram analisadas pelo teste *t* e foram consideradas significativas quando $*P < 0,05$.

Figura 6

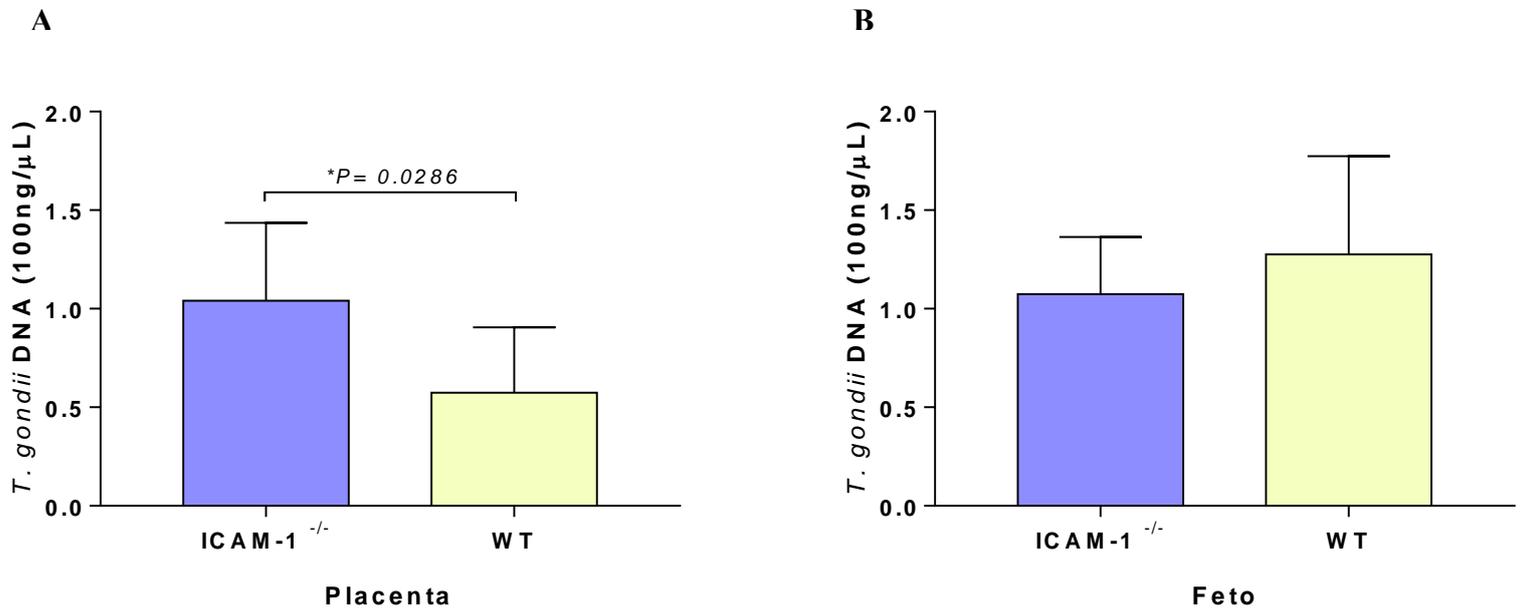


Figura 6: Carga parasitária nas placentas e fetos de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT 14dg/7di. Fêmeas ICAM-1^{-/-} (n=6) e WT (n=6) foram infectadas com 5 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) no 8º dia após a detecção da rolha vaginal e foram eutanasiadas no 14º dia gestação (14dg/7di). Placentas e fetos foram coletados para a análise do parasitismo por qPCR. A carga parasitária foi mensurada nas (A) placentas e (B) tecidos fetais. Diferenças estatísticas entre os grupos ICAM-1^{-/-} e WT foram analisadas pelo teste *t* e foram consideradas significativas quando **P* < 0,05.

Figura 7

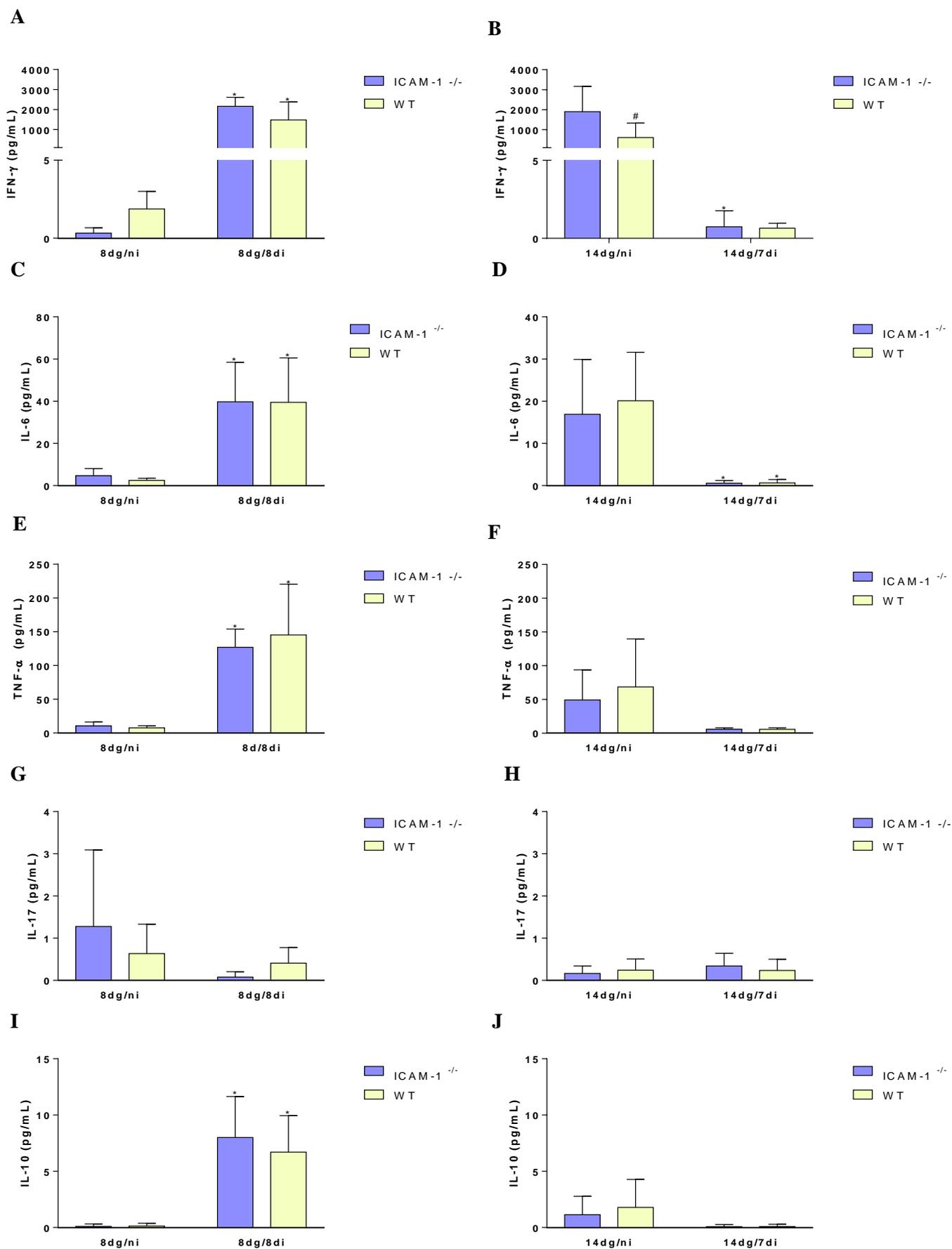


Figura 7: Níveis de citocinas no soro de fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT 8dg/8di, 8dg/ni, 14dg/7di e 14dg/ni. O soro das fêmeas ICAM^{-/-} e WT 8dg/8di, 8dg/ni, 14dg/7di e 14dg/ni foi coletado no dia da eutanásia e analisados quanto à produção de citocinas por CBA. (A e B) IFN- γ , (C e D) TNF- α , (E e F) IL-6, (G e H) IL-17, (I e J) IL-10. Diferenças estatísticas foram avaliadas utilizando o teste Two-Way ANOVA, com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $P < 0,05$ foram significativas entre fêmeas ICAM-1^{-/-} ou WT não infectadas com os respectivos controles infectados; # $P < 0,05$ foi significativo entre fêmeas ICAM-1^{-/-} e WT na condição não infectada.

TABELAS

Tabela I: Resultados do sucesso gestacional em camundongos C57BL/6 ICAM-1^{-/-} e C57BL/6 WT não infectados (8dg/ni) ou infectados com cinco cistos da cepa *Toxoplasma gondii* ME-49 por via oral no 1º dia da detecção de rolha vaginal e eutanasiadas no 8º de gestação (8dg/8di).

Linhagem de camundongos	Grupos experimentais	Sobrevivência %	Fêmeas com fetos reabsorvidos %	Sítios de reabsorção/Sítios de implantação ^a	Sítios de implantação %	Taxa de perda embrionária ^b %
ICAM-1 ^{-/-}	8dg/8di	6/6 (100%)	4/6 (66,6%)	12/19	37%	63%
	8dg/ni	6/6 (100%)	1/6 (16,6%)	2/47	95,7%	4,3%
WT	8dg/8di	6/6 (100%)	0/6 (0%)	0/48	100%	0%
	8dg/ni	6/6 (100%)	1/6 (16,6%)	2/40	95%	5%

^a Sítios de reabsorção foram identificados visualmente. Sítios de implantação com aparência hemorrágica e coloração marrom foram definidos como sítios de reabsorção.

^b A taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações.

Tabela II: Resultados do sucesso gestacional em camundongos C57BL/6 ICAM-1^{-/-} e C57BL/6 WT não infectados (14dg/ni) ou infectados com cinco cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* por via oral no 8º dia após a detecção de rolha vaginal e eutanasiadas no 14º dia de gestação (14dg/7di).

Linhagem de camundongos	Grupos experimentais	Sobrevivência %	Fêmeas com fetos reabsorvidos (%)	Sítios de reabsorção/Sítios de implantação ^a	Sítios de implantação %	Taxa de perda embrionária ^b (%)
ICAM-1 ^{-/-}	14dg/7di	6/6 (100%)	4/6 (66,6%)	4/33	88%	12%
	14dg/ni	6/6 (100%)	2/6 (33,3%)	3/40	92,5%	7,5%
WT	14dg/7di	6/6 (100%)	1/6 (16,6%)	3/35	91%	9%
	14dg/ni	6/6 (100%)	2/6 (33,3%)	5/53	90,5%	9,5%

^a Sítios de reabsorção foram identificados visualmente. Sítios de implantação com aparência hemorrágica e coloração marrom foram definidos como sítios de reabsorção.

^b A taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações.

Tabela III: Resultados do sucesso gestacional em camundongos C57BL/6 ICAM-1^{-/-} e C57BL/6 WT não infectados (19dg/ni) ou infectados com cinco cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* por via oral no 8º dia após a detecção de rolha vaginal e eutanasiadas no 19º dia de gestação (19dg/12di).

Linhagem de camundongos	Grupos experimentais	Sobrevivência %	Fêmeas com fetos reabsorvidos %	Sítios de reabsorção/Sítios de implantação ^a	Sítios de implantação %	Taxa de perda embrionária ^b (%)
ICAM-1 ^{-/-}	19dg/12di	6/6 (100%)	4/6 (66,6%)	6/48	86,5%	13,5%
	19dg/ni	6/6 (100%)	5/6 (83,3%)	6/45	86,7%	13,3%
WT	19dg/12di	5/6 (83%)	3/5 (60%)	3/40	92,5%	7,5%
	19dg/ni	6/6 (100%)	4/6 (66,6%)	4/39	89,7%	10,3%

^a Sítios de reabsorção foram identificados visualmente. Sítios de implantação com aparência hemorrágica e coloração marrom foram definidos como sítios de reabsorção.

^b A taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações.

Tabela IV: Resultados do sucesso gestacional em camundongos C57BL/6 ICAM-1^{-/-} e C57BL/6 WT não infectados (19dg/ni) ou infectados com cinco cistos da cepa *Toxoplasma gondii* ME-49 por via oral no 12º dia após a detecção de rolha vaginal e eutanasiadas no 19º dia de gestação (19dg/8di).

Linhagem de camundongos	Grupos experimentais	Sobrevivência %	Fêmeas com fetos reabsorvidos %	Sítios de reabsorção/Sítios de implantação ^a	Sítios de implantação %	Taxa de perda embrionária ^b (%)
ICAM-1 ^{-/-}	19dg/8di	6/6 (100%)	4/6 (66,6%)	18/44	60%	40%
	19dg/ni	6/6 (100%)	5/6 (83,3%)	6/45	86,7%	13,3%
WT	19dg/8di	6/6 (100%)	3/6 (50%)	11/42	73,8%	26,2%
	19dg/ni	6/6 (100%)	4/6 (66,6%)	4/39	89,7%	10,3%

^a Sítios de reabsorção foram identificados visualmente. Sítios de implantação com aparência hemorrágica e coloração marrom foram definidos como sítios de reabsorção.

^b A taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações.

CAPÍTULO II

Células trofoblásticas mesenquimais humanas (TS^{CT}) recapitulam a sensibilidade de células da placenta à infecção por *Toxoplasma gondii* conferindo um modelo promissor para o estudo da toxoplasmose congênita

1. INTRODUÇÃO

1.1. Placenta: estrutura e mecanismos de defesa aos patógenos

A placenta é um órgão altamente especializado da gestação que, junto com as membranas fetais e o líquido amniótico, suportam o crescimento e desenvolvimento do feto; tem como função nutrir, permitindo o transporte de carboidratos, amino ácidos, lipídeos, água, sais inorgânicos, minerais e vitaminas; permitir trocas de gases entre mãe e feto, uma vez que esta estrutura é permeável ao oxigênio e dióxido de carbono; e é considerada uma barreira efetiva contra diversos agentes, além de orquestrar adaptações maternas para a gestação (GUDE et al., 2004; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012; TURCO; MOFFETT, 2019), incluindo a secreção de mais de 100 peptídeos e hormônios esteroides que modulam a fisiologia materna, como gonadotropina coriônica, hormônio de crescimento placentário ou lactogênio placentário, progesterona e insulina (GUDE et al., 2004; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012; VELICKY; KNOFLER; POLLHEIMER, 2016).

A placenta humana é composta por uma porção materna (decídua) e outra fetal (placa coriônica) (GUDE et al., 2004). As células decíduais são derivadas de fibroblastos, que se diferenciam e formam a decídua, as quais secretam citocinas, incluindo IL-15, fatores de crescimento e agentes imunomoduladores envolvidos na regulação da invasão do trofoblasto (VERMA et al., 2000). A placa coriônica é formada pelos vilos coriônicos, que formam a própria barreira placentária, organizadas em inúmeras ramificações com o objetivo de aumentar a área de superfície com o sangue materno (GUDE et al., 2004; ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

A unidade funcional da placenta humana é formada por árvores vilosas compostas por vilos flutuantes e vilos de ancoragem (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). Uma única camada de sinciotrofoblasto multinucleados contíguos (SYN) reveste a superfície mais externa das árvores vilosas da placenta humana e atua como a principal barreira celular entre o compartimento fetal e o sangue materno (ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012; ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). Subjacente à camada SYN está a camada de citotrofoblasto mononucleado indiferenciado (CYT). CYTs são células trofoblásticas progenitoras e podem se diferenciar e fundir para reabastecer a camada SYN ou se diferenciar em trofoblastos extravilosos mononucleados (EVTs), que possuem um perfil de células invasivas, localizados nas extremidades das vilosidades de ancoragem que se fixam na decídua basal, ou invadem a vasculatura materna, tendo um importante papel no remodelamento das artérias espiraladas (ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012; ARORA et

al., 2017; ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). A região central dos vilos coriônicos é constituído por macrófagos fetais (células Hofbauer), fibroblastos, células endoteliais fetais que revestem capilares vilosos e suas membranas basais associadas (ARORA et al., 2017).

Uma vez que os espaços intervilosos são preenchidos por sangue, a placenta está continuamente exposta aos patógenos que estejam circulando sistemicamente na circulação materna. Dessa maneira, a placenta apresenta diversos mecanismos de defesa para proteger o feto de eventuais infecções (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). A arquitetura da placenta humana permite que a camada de SYN, considerada a defesa celular mais forte, esteja presente na superfície mais externa. SYN forma uma única célula contínua e, portanto, carece de junções celulares que podem ser exploradas por patógenos ou moduladas por sinais inflamatórios (ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012). Outra propriedade física que confere resistência microbiana ao SYN é a densa rede citoesquelética que cria uma densa borda em escova formada na superfície apical dessas células (OCKLEFORD; WAKELY; BADLEY, 1981; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012). Esta borda em escova fornece uma vasta área de superfície para troca de nutrientes e gases entre os compartimentos materno e fetal, mas também protege da invasão microbiana direta, em parte por causa da densa rede de actina subjacente (ZELDOVICH et al., 2013). A placenta tem uma série de mecanismos imunes inatos para proteger o feto de infecções congênitas, incluindo a expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores toll-like (TLRs) (MA et al., 2007; HOO; NAKIMULI; VENTO-TORMO, 2020), a expressão constitutiva de moléculas antivirais, como interferons do tipo III (IFN- λ) (BAYER et al., 2016), e a liberação de peptídeos antimicrobianos, indução de quimionas como CCL22, sugerindo que a infecção do parasito altera ou sinaliza para as células imunes maternas (ANDER et al., 2018). Além disso, a expressão de SYN do receptor Fc neonatal também sugere um papel protetor para a IgG materna dentro do compartimento fetal por meio do desenvolvimento de imunidade passiva (MALTEPE; FISHER, et al., 2015).

Embora a placenta represente uma formidável barreira, microrganismos podem colonizar a placenta e romper a barreira materno-fetal e ocasionar graves consequências para o desenvolvimento fetal. Coletivamente, estes patógenos são chamados de patógenos TORCH, com a sigla referindo-se a *Toxoplasma gondii*, outros agentes, vírus da rubéola, citomegalovírus (CMV) e vírus herpes simples (HSV) (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

É sabido que existe uma susceptibilidade diferencial entre as subpopulações de trofoblasto aos diversos microrganismos (ARORA et al., 2017). Em humanos, cultura de vilos placentários mostrou que CMV é capaz de infectar o CYT e outras células da placenta, mas não o SYN (FISHER et al., 2000). Sinciciotrofoblasto também mostrou grande resistência a infecções por HSV (DELORME-AXFORD et al., 2013) e ZIKV (BAYER et al., 2016). Esta célula também apresentou alta resistência à infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*, enquanto que as células EVTs mostraram ser muito susceptíveis, funcionando como porta de entrada para a infecção bacteriana nos compartimentos internos da placenta (ROBBINS et al., 2010). Similarmente, estudos realizados em cultura de células ou vilos placentários mostraram que SYN é muito resistente a infecções por *T. gondii* (ANDER et al., 2018; ROBBINS et al., 2012). Trabalhos anteriores avaliando o crescimento e invasão do parasita nas células SYN e CYT mostraram que células SYNs resistem à infecção por *T. gondii* por serem refratárias à adesão do parasita, restringem a replicação do parasita e/ou serem parasiticidas (ANDER et al., 2018; MCCONKEY et al., 2016; ROBBINS et al., 2012). Em contraste, CYTs e EVTs foram suscetíveis à infecção por *T. gondii* (ROBBINS et al., 2012).

1.2. Modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da transmissão congênita de *T. gondii*

Os mecanismos intrínsecos envolvidos na restrição do crescimento e invasão de *T. gondii* no SYN e mecanismos relacionados à suscetibilidade das células CYT ao parasito ainda são mal compreendidos, e modelos *in vitro* que replicam fielmente a biologia de CYT, SYN e EVT são críticos para a compreensão desses processos à nível molecular.

As linhagens de células trofoblásticas imortalizadas derivadas de coriocarcinomas, incluindo BeWo, JEG-3 e JAR são frequentemente utilizadas, para o estudo da toxoplasmose congênita, porém elas não se fundem espontaneamente para formar células SYN (ANDER et al., 2019). Ademais, estudos tem mostrado que BeWo podem se induzidas à sincicialização utilizando reagentes que aumentam os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato (cAMP) para aumentar a expressão de proteínas de fusão de retrovírus endógenos responsáveis pela fusão CYT em SYN (WICE et al., 1990); entretanto, a elevação dos níveis intracelulares de cAMP pode produzir outros fenótipos, e essas células ainda permanecem suscetíveis à infecção microbiana (ANDER et al., 2018). Contudo, células JEG cultivadas em um sistema de baseado em biorreator

tridimensional e cocultivadas com células endoteliais humanas foram capazes de se fundirem e recapitularam a resistência a infecção por *T. gondii* (MCCONKEY et al., 2016). As células trofoblásticas primárias se diferenciam espontaneamente em SYN, porém este modelo celular apresenta limitações, como tempo curto de manutenção em cultura, e dificuldade para manipulações genéticas (ANDER et al., 2019).

Explantos de vilos placentários também são considerados bons modelos para o estudo da transmissão congênita, por manterem a estrutura da placenta, possuem complexidade multicelular, e podem ser isolados em todos os estágios da gravidez (LOWE; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2018). No entanto, a obtenção de placentas nos estágios iniciais da gestação geralmente possui regulamentações governamentais muito restritivas em muitos países (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

Modelos animais, principalmente os camundongos são comumente utilizados para o estudo da transmissão de *T. gondii* na interface materno-fetal. Eles são considerados ótimos modelos de estudo *in vivo*, pois possuem curto período de gestação, grande ninhada e podem ser modificados geneticamente, permitindo avaliar diversas variáveis. Entretanto, diferenças na estrutura da placenta e na montagem da resposta imunológica podem dificultar a interpretação dos resultados usando modelos de camundongos para estudos das vias de transmissão vertical na placenta humana (MALTEPE; FISH, 2015; ARORA et al., 2017).

Diante de todas essas limitações no estudo da transmissão congênita, caracterizamos um novo modelo celular de células trofoblásticas mesenquimais humanas (TS^{CT}) previamente isolado e descrito por Okae e colaboradores (2018), para elucidar a suscetibilidade diferencial entre TS^{SYN} e TS^{CYT}. TS^{CT} são células TS^{CYT} isoladas de placentas humanas de primeiro trimestre e podem ser estabelecidas em cultura em um estado proliferativo indiferenciado por até 5 meses após a ativação das vias de Wnt e fator de crescimento epidermal (EGF), e inibição do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), histona deacetilase (HDAC) e proteína quinase associada a Rho (ROCK) (OKAE et al., 2018). Em condições de cultura adequadas, essas células podem ser induzidas a formar TS^{EVTs} ou TS^{SYNs}, sugerindo que a TS^{CT} possui um perfil bipotente. Além disso, os dados do transcriptoma e do metiloma indicaram que TS^{CT} tem muitas propriedades exclusivas das células trofoblásticas primárias (OKAE et al., 2018).

As células trofoblásticas mesenquimais humanas representam uma potente ferramenta para a caracterização molecular e funcional de células trofoblásticas humanas. Além do mais, elas podem ajudar a compreender os mecanismos envolvidos nos abortos,

pré-eclâmpsia e restrição do crescimento intrauterino. Por fim, devido a capacidade de diferenciação de CYT em SYN e EVT, essas células representam um ótimo modelo para estudar os mecanismos envolvidos na resistência e susceptibilidade entre as diferentes populações de trofoblasto contra os diferentes tipos de patógenos, incluindo *T. gondii*, que são capazes de atravessar a placenta.

2. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos intracelulares envolvidos na restrição da invasão e crescimento de *T. gondii* em células sinciciotrofoblásticas e os mecanismos relacionados à suscetibilidade das células citotrofoblásticas ao parasito ainda são pouco compreendidos. A utilização de modelos *in vitro* que repliquem fielmente a biologia de citotrofblastos, sinciciotrofblasto e trofblasto extraviloso são extremamente importantes para a compreensão desses processos à nível molecular. Embora as linhagens de células trofbásticas imortalizadas derivadas de coriocarcinomas, incluindo BeWo, JEG-3 e JAR sejam frequentemente utilizadas, estas células não se fundem espontaneamente para formar células sinciciotrofoblásticas (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019), além disso, mesmo quando são sincicializadas eles não reproduzem a sensibilidade das células trofbásticas primárias ou explantes de vilos placentários (ANDER et al., 2018; MCCONKEY et al., 2016). Por outro lado, as células trofbásticas primárias se diferenciam espontaneamente em sinciciotrofblasto, mas elas apresentam desafios, pois são difíceis de serem manipuladas geneticamente e apresentam curto tempo de vida em cultura *in vitro* (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). Assim, nosso trabalho se justifica por caracterizar as células trofbásticas mesenquimais humanas para avaliar se elas representam um bom modelo de trofblasto, capazes de recapitular a sensibilidade das células trofbásticas primárias para entender os mecanismos envolvidos na resistência das células sinciciotrofoblásticas à infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar células trofoblásticas mesenquimais TS^{CT} para avaliar se elas recapitulam a sensibilidade de células trofoblásticas primárias humanas frente a infecção por *T. gondii*, além identificar diferenças na expressão de genes entre as células citotrofoblásticas e sinciciotrofoblásticas após a infecção com o parasito.

3.2. Objetivos específicos

- Manutenção de células TS^{CT} em cultura e diferenciação de células citotrofoblásticas (TS^{CTY}) em sinciciotrofoblasto (TS^{SYN}) em população mista (TS^{CTY} e TS^{SYN}) e TS^{SYN} 3D.
- Avaliar o parasitismo em células TS^{CTY} e TS^{SYN} após 24h de infecção com *T. gondii*.
- Acompanhar a progressão do crescimento intracelular de *T. gondii* em células TS^{CTY} e TS^{SYN} nos tempos de 24, 48 e 72h.
- Quantificar parasitos intracelulares e extracelulares para avaliar a invasão de *T. gondii* nas células TS^{CTY} e TS^{SYN}.
- Mensurar a expressão gênica de CCL22, bem como dosar a secreção dessa quimiocina no sobrenadante de células TS^{CTY} e TS^{SYN} *mock* infectadas ou infectadas por *T. gondii*.
- Avaliar a expressão gênica em células TS^{CTY} e TS^{SYN} *mock* infectadas ou infectadas por *T. gondii*.
- Analisar vias moduladas positivamente ou negativamente em células TS^{CTY} e TS^{SYN} *mock* infectadas ou infectadas por *T. gondii*.
- Analisar a expressão gênica em parasitos oriundos de cultura de células TS^{CTY} ou TS^{SYN}.
- Identificar vias que são moduladas diferentemente em parasitos que estavam associados ou que infectaram células TS^{CTY} ou TS^{SYN}.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células trofoblásticas mesenquimais humanas (TS^{CT})

Células trofoblásticas mesenquimais (TS^{CT}) foram isoladas de placentas de primeiro trimestre e caracterizadas como células similares às células trofoblásticas humanas primárias através de estudos de transcriptoma (OKAE et al., 2018). Elas foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Okae da Universidade de Tohoku, Japão. As células foram cultivadas em condições específicas, como descritas previamente (OKAE et al., 2018). Brevemente, garrafas de 75 cm² foram revestidas com 5 µg/mL colágeno tipo IV (Corning, New York, NY, USA) e 2 µg/mL de iMatrix-55 (AMSBIO, Abingdon, UK) a 37 °C por 2 horas. Em seguida, as garrafas de cultura foram lavadas com solução salina fosfatada estéril (PBS) 1X, e foi adicionado meio TS [(DMEM/F12 (Gibco, Waltham, MA, USA), 1% ITS-X100 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US), 0,3% de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos (Sigma, St Louis, MO, USA), 1,5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma), 50 ng/EGF (ThermoFisher Scientific), 0,1 mM 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA), 0,2% soro fetal bovino (SFB) (ThermoFisher Scientific), and 0,5% Penicillina-Streptomicina (ThermoFisher Scientific))] suplementado com 2 µM do inibidor da enzima GSK3α (CHIR99021) (Cayaman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), 0,5 µM do inibidor do receptor de TGF-β1 (A83-01) (StemRD, Burlingame, CA, USA), 1 µM do inibidor do receptor de TGF-β1 (SB431542) (StemRD), 0,8 mM ácido valpróico (VPA) (APExBIO, Houston, TX, USA) e 5 µM inibidor de ROCK (Y27632) (Wako, Osaka, Japão) por no mínimo 10 minutos a 37 °C. Durante essa etapa de revestimento com colágeno e adição do meio TS, as células foram tripsinizadas usando TrypLE (Sigma) por 10 minutos a 37 °C, lavadas com meio TS, centrifugadas a 380 x g por 1 minuto. Ao completar o tempo de incubação do meio TS na estufa, as células foram adicionadas às garrafas numa proporção de 1: 3 e incubadas na estufa à 37 °C e 5% CO₂ até atingirem 80% de confluência.

4.2. Diferenciação de células citotrofoblasto (TS^{CYT}) em sinciotrofoblasto (TS^{SYN}) e infecção com *T. gondii*

Para a indução de células sinciotrofoblastos (TS^{SYN}) a partir de células TS^{CT}, foram usados dois protocolos de diferenciação como previamente descritos por Okae et al., 2018, com algumas modificações. Brevemente, para a obtenção da população mista (TS^{CYT} + TS^{SYN}), foi utilizado meio TS suplementado apenas com 5 µM Y27632, e para TS^{SYN} (3D), nós usamos o meio ST (3D) [(DMEM/F12 (Gibco), ITS-X100

(ThermoFisher Scientific), 0,3% BSA livre de ácidos graxos (Sigma), 0,2% FBS (ThermoFisher Scientific), 0.5% Penicillina-Streptomicina (ThermoFisher Scientific), 0.1 mM 2-mercaptoetanol (ThermoFisher Scientific), suplementado com 2,5 μ M Y27632 (Wako), 2 μ M forskolina (Sigma), 4% EGF (ThermoFisher Scientific), and 50 ng/mL de substituto *knockout* de soro bovino (KSR) (Gibco)]. Em ambos os casos, o meio foi adicionado em placas de 24 e de 6 poços por 10 minutos à 37 °C, e as células foram plaqueadas na proporção de $2,5 \times 10^4$ em lamínulas redonda de 13 mm em placas de 24 poços ou $1,5 \times 10^5$ (placas de 6 poços). Para a população mista (TS^{CYT} + TS^{SYN}), o meio foi trocado no dia 3, e as células foram infectadas no dia 4 por 24 horas. Por outro lado, na cultura de TS^{SYN} (3D) foi adicionado mais meio ST (3D) no dia 3, e no dia 5 o meio foi retirado e substituído por um meio novo, sem a adição de forskolina. Para a infecção, as células foram *mock* infectadas ou infectadas com *T. gondii* no dia 6 e analisadas no dia 7 (24 horas de infecção).

4.3. Cultura de parasitos

Toxoplasma gondii, cepa RH (YFP), foram cultivados em monocamadas de células HFF em meio Eagle Dulbecco Modificado (cDMEM) (ThermoFisher Scientific) (100 U/ml penicilina/estreptomicina, 100 μ g/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 10% FBS, 3,7 g de NaH₂CO₃/L (ThermoFisher Scientific)) e incubados à 5% de CO₂ e 37 °C. Para os ensaios de infecção, as monocamadas de células infectadas foram retiradas da garrafa com auxílio de *cell scraper* e em seguida, as células foram lisadas para a liberação de taquizoítas de *T. gondii* com ajuda de seringas. Parasitos livres foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos. Para infecções *mock* (tratamento com meio sem a presença de parasitos), foi adicionado meio novo aos parasitos, os quais foram submetidos a uma filtragem através do filtro 0,22 μ m (Millipore, Burlington, MA, EUA). Em seguida, o meio resultante da filtração foi utilizado para tratar as condições não infectadas.

4.4. Imunofluorescência

Células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram plaqueadas numa proporção de $2,5 \times 10^4$ em lamínulas redondas de vidro de 13 mm em placas de 24 poços, foram *mock* infectadas ou infectadas com *T. gondii* cepa RH-YFP. Nos experimentos realizados para verificar a proliferação intracelular do parasito em apenas em 24 horas, a infecção nas células TS^{SYN} ocorreu no dia 6 e para TS^{CYT}, no dia 3, numa proporção de 5 parasitos/célula. Porém para experimentos realizados para observar a proliferação de *T. gondii* ao longo do tempo

(24, 48 e 72 horas), a infecção nas células TS^{SYN} foi feita no dia 5 e para células TS^{CYT}, no dia 3, numa proporção de 1,5 parasito/célula. Para que as células TS^{CYT} e TS^{SYN} fossem infectadas no mesmo dia, foi necessário iniciar o procedimento de diferenciação três dias antes de plaquear as células TS^{CYT}.

Para a reação de imunofluorescência, as células foram fixadas utilizando 4% de paraformaldeído (PFA) (ThermoFisher Scientific) por 12 minutos, lavadas com PBS 1X (ThermoFisher Scientific) e então, foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 por 10 minutos. Após isso, as células foram incubadas com marcadores de TS^{SYN}, anti-Sindecano-1 (SDC-1) (1:200) (HPA006185, Sigma), e marcadores de TS^{CYT}, anti-Integrina alfa-6 (ITGA6) (1:1000) (MA5-16884, ThermoFisher Scientific) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e incubadas anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 e 647 (A-21209 e A-32733, Life Technologies Alexa Fluor H+L, Calrsbad, CA, USA) por 45 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e montadas utilizando meio de montagem *Vectashield* contendo DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Por fim, os marcadores celulares foram usados para distinguir TS^{CYT}s e TS^{SYNs} para calcular a porcentagem de cada uma das células por lamínula a fim de verificar a porcentagem de sucesso de diferenciação de citotrofoblasto em sinciciotrofoblasto. Além disso, foi possível avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* a partir da avaliação do tamanho dos vacúolos parasitários por área celular. Para isso, as lamínulas foram divididas em quatro campos e três fotos de cada campo foram feitas utilizando o microscópio de epifluorescência. As imagens foram analisadas utilizando o programa *Image J* (NIH) para avaliar a intensidade de fluorescência e o tamanho da área de cada vacúolo por área celular. Em seguida, foi calculada uma média total do tamanho dos vacúolos por área celular em cada imagem.

Para o ensaio de invasão de *T. gondii*, as células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram cultivadas em lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços proporção de $2,5 \times 10^4$, infectadas com *T. gondii* (RH-YFP) no dia 3 (TS^{CYT}) e dia 6 (TS^{SYN}) por 2 horas. Em seguida, os poços contendo as lamínulas foram lavados para a retirada de parasitos não aderidos à superfície celular e as células foram fixadas utilizando 4% de PFA por 12 minutos. Parasitos extracelulares dos intracelulares foram distinguidos pela expressão diferencial de fluorescência (CARRUTHERS et al., 2000). Parasitos extracelulares foram previamente marcados com anti-*T. gondii* (1:1000) (PA1-7256 ThermoFisher Scientific) por 1 hora em temperatura ambiente, e em seguida, foi utilizado anticorpo secundário

conjugado com Alexa Fluor 647. Após essa etapa, as células foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 e marcadas com anti-ITGA-6 e anti SDC-1 por adicionais 1 hora, e em seguida com anticorpo secundário conjugada com Alexa Fluor 594. Por fim as lamínulas foram montadas, como descrito acima. As lamínulas foram divididas em quatro campos e três imagens foram fotografadas de cada campo. A taxa de invasão foi calculada pelo número de parasitos intracelulares, marcados como YFP⁺/647⁻, enquanto que os parasitos totais foram calculados pela soma de parasitos intracelulares, marcados como YFP⁺/647⁻ e parasitos extracelulares YFP⁺/647⁺.

4.5. RT-qPCR

Células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram plaqueadas na proporção de $1,5 \times 10^5$ e 1×10^5 , respectivamente, em placas de 6 poços e incubadas em à 37 °C e 5% de CO₂. Ambas as células foram *mock* infectadas ou infectadas com a mesma quantidade de taquizoítas de *T. gondii* numa proporção de 5×10^5 parasitos por poço durante 24 horas. A infecção das células TS^{SYN} ocorreu no dia 6 e das TS^{CYT}, no dia 3. Após isso, o meio foi coletado e armazenado no freezer -80 °C. As células foram lavadas com PBS 1X, e em seguida, foi adicionado tampão de lise RLT (Qiagen, Hilden, Alemanha) contendo 10% de β-mercaptoetanol para a lise celular. Posteriormente, o RNA foi extraído usando o kit de extração de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen), analisado pelo gel de eletroforese e quantificado utilizando o aparelho de NanoDrop (ThermoFisher Scientific) para garantir a qualidade do RNA. Em seguida, cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o kit SuperScript IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific). Após a obtenção de cDNA, este foi diluído em água estéril livre de RNA na proporção de 1:10 e por fim, 2 µL de cDNA foi misturado à 5 µL de tampão SYBR Green (BioRad, Hercules, Ca, EUA) e 0,25 µL (1µM) de ambos os primers *forward* e *reverse*. Genes foram amplificados usando um protocolo padrão (95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto). Os dados foram analisados utilizando o programa “QuantStudio™ Design & Analysis” (ThermoFisher Scientific) e exportados para o programa Excel para avaliar os valores ciclos *threshold* (CT) e a $2^{-\Delta\Delta CT}$ para as análises de *fold change*. Os *primers* GRA1 e CCL22 foram utilizados como genes alvos e GAPDH como gene de referência. *T. gondii* GRA1 *forward*: TTAACGTGGAGGAGGTGATTG; GRA1 *reverse*: TCCTCTACTGTTTCGCCTTTG e CCL22 humano *forward*: GTGGTGTTGCTAACCTTC; CCL22 *reverse*:

GGCTCAGCTTATTGAGAATC GAPDH humano *forward*:
 TGACGGTGCCATGGAATTTG; GAPDH reverse: CACATCGCTCAGACACCATG.

4.6. Sequenciamento de RNA e análises utilizando DESeq2 e Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA)

Células TS^{SYN} e TS^{CYT} foram plaqueadas na proporção de $1,5 \times 10^5$ e 1×10^5 , respectivamente e *mock* infectadas ou infectadas com a mesma quantidade de taquizoítas de *T. gondii*, na proporção de 5×10^5 parasitos por poço durante 24 horas. A infecção das células TS^{SYN} ocorreu no dia 6 e das TS^{CYT}, no dia 3. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X e adicionados tampão RLT com 10% de β -mercaptoetanol para a extração de RNA. As bibliotecas de sequenciamento de mRNA e sequenciamento de nova geração (Illumina) foram preparadas nas instalações do Núcleo de Sequenciamento de Ciências da Saúde no Hospital Infantil de Pittsburgh. As amostras foram sequenciadas através de NextSeq 550 (Illumina), e *strand-specific*, 150 bp, *single-end* RNA foram usados. Por fim, as leituras das bibliotecas foram mapeadas com o genoma humano e do parasito utilizando o programa CLC Genomics Workbench v. 11.0.

Após a obtenção da leitura dos genes totais, os dados foram analisados utilizando o pacote DESeq2 no programa estatístico R (VARET et al., 2016) usando configurações padrões para identificar a abundância de transcritos significativamente diferentes. Esses dados também foram usados para calcular os valores relativos de *log2-fold change* entre os dois tipos celulares e o parâmetro de infecção. Além disso, os dados foram pré-classificados e avaliados no programa de Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) para identificar conjuntos de genes que foram enriquecidos negativamente ou positivamente. Para a análise de enriquecimento do conjunto de genes dos parasitos que infectaram células TS^{CYT} e TS^{SYN} utilizamos conjuntos de genes previamente criados por Croken e colaboradores (2014) os quais foram executadas no GSEA.

4.7. ELISA

Para avaliar se TS^{CYT} e TS^{SYN} seriam capazes de produzir e liberar a quimiocina CCL22 e se a infecção por *T. gondii* estimularia essa produção, foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA utilizando o sobrenadante de células TS^{CYT} e TS^{SYN} *mock* infectadas ou infectadas com *T. gondii*, de acordo com as instruções do fabricante. (R&D Systems, Mineapólis, MN, EUA). Brevemente, a placa foi incubada com anticorpo

monoclonal anti-CCL22 *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS Tween 0,05% para posterior bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS a 1% de soro albumina bovina (BSA). Após 1 hora, os poços foram novamente lavados, e as amostras e curvas padrões foram adicionadas e incubadas por mais 2 horas a temperatura ambiente. A placa foi submetida a consecutivas lavagens e em seguida o anticorpo de detecção anti-CCL22 foi incubado por mais 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados e adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por 20 minutos. Por fim, a placa foi lavada com PBS tween e foi acrescido 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) para a detecção dos imunocomplexos. Após a placa revelar, foi adicionado H₂SO₄ para parar a reação. A leitura da placa foi realizada em uma leitora de placas a 450 nm. Os dados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva de referência (7.8 pg/mL).

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas (além das análises descritas previamente nos dados de RNAseq) foram feitas usando o programa *GraphPad Prism 7.0* (La Jolla, CA, EUA). Diferenças estatísticas entre as condições foram realizadas através do Teste *t* ou One-Way ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, quando apropriados.

5. RESULTADOS

5.1. Células sinciciotrofoblastos (3D) foram eficientemente diferenciadas a partir de células citotrofoblastos

As células TS^{CYT} foram cultivadas e diferenciadas em TS^{SYN} nas mesmas condições descritas por Okae e colaboradores (2018) e nós quantificamos o sucesso de diferenciação usando SDC-1, como marcador de TS^{SYN} e ITGA-6, como marcador de TS^{CYT} . Nós avaliamos a porcentagem de marcação por área celular e encontramos que TS^{CYT} foram negativas para SDC-1, como esperado (Figura 1A e 1B), enquanto que em células TS^{SYN} cultivadas em meio TS (3D) ~90% das células apresentaram marcação para SDC-1, e, portanto, os dados mostram uma alta eficiência de diferenciação de TS^{CYTs} em TS^{SYNs} . Quando o meio TS foi suplementado apenas com Y27632, gerou uma população mista de ~45% de TS^{CYT} e 55% de células TS^{SYN} (Figura 1A e 1B). Esses dados validaram com sucesso a linhagem de células TS^{CT} obtidas a partir do laboratório do Professor Okae como sendo capazes de serem diferenciadas de TS^{CYT} para TS^{SYN} .

Para validar ainda mais o processo de diferenciação em nosso laboratório, usamos RNA-seq para quantificar os níveis de transcrição para vários marcadores de SYN (CGB2, CGB7, CGB5, CGB3, CGB8 e SDC-1) e o marcador de CYT (ITGA-6). As células TS^{SYN} em meio 3D apresentaram maior expressão gênica de SDC-1 e membros da família de genes CGB, e níveis mais baixos de ITGA-6 (Figura 1C), enquanto as células TS^{CYT} apresentaram níveis mais elevados de transcrição de ITGA-6 e níveis mais baixos de SDC-1 e elevados níveis de transcrição de membros da família CGB (Figura 1C). Interessantemente, a infecção por *T. gondii* não alterou a expressão dos genes CGB, SDC-1 e ITGA-6. Esses dados mostram que fomos capazes de reproduzir células TS^{SYN} e que o meio 3D é o protocolo mais eficiente para diferenciar as células TS^{CYT} em células TS^{SYN} , conforme descrito anteriormente por Okae e colaboradores (2018).

5.2. Células TS^{SYN} são mais resistentes à infecção por *T. gondii* do que as células TS^{CYT}

Após avaliar a eficiência de diferenciação das células TS^{SYN} , nosso objetivo foi verificar se as células trofoblásticas mesenquimais reproduziam a mesma sensibilidade à infecção por *T. gondii*, quando comparada às células trofoblásticas humanas primárias (PHT), nas quais CYT são caracterizadas por serem mais suscetíveis à infecção ao parasito do que as células SYN (ANDER et al., 2018). Para isso, cultivamos TS^{CYT} , TS^{SYN} (3D) e TS^{SYN} (população mista) separadamente e, em seguida, as células foram infectadas

com parasito RH-YFP na proporção de 5:1 por 24 horas. De acordo com os nossos dados, qualitativamente, observamos que as células TS^{CYT} apresentaram mais vacúolos parasitóforos e mais parasitos em cada vacúolo do que as células TS^{SYN}, tanto na população mista, quanto na cultura 3D (Figura 2A), sugerindo que TS^{SYN} é resistente à infecção por *T. gondii*. Nós também usamos RT-qPCR para o gene GRA1 de *T. gondii* para avaliar quantitativamente o número de parasitos presente em ambas as células. A abundância de GRA1 de *T. gondii* nas células TS^{SYN} foi ~ 0,5 vezes menor se comparado a TS^{CYT} ($P = 0,0011$) (Figura 2B), indicando a dramática diferença no número de parasitos que estão associados e replicando dentro de TS^{CYT} em comparação com TS^{SYN}.

Considerando os nossos resultados na eficiência de diferenciação e os dados de parasitismo, para os próximos experimentos apenas a cultura de TS^{SYN} 3D foi usada como modelo de sinciciotrofoblasto.

5.3. *T. gondii* não é capaz de crescer em TS^{SYNs} ao longo do tempo

Primeiro, analisamos a resistência de TS^{SYN} derivado de células TS^{CYT} após a infecção por *T. gondii* por 24 horas, e o próximo passo foi verificar se essas células poderiam restringir a infecção por *T. gondii* por um tempo maior, de 72 horas. Para isso, as células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 1,5 parasito/célula, e a proliferação intracelular do parasito foi quantificada usando imunofluorescência após 24, 48 e 72 horas de infecção. Como esperado, verificamos que *T. gondii* foi capaz de crescer significativamente ao longo do tempo nas células TS^{CYT} ($P < 0,0001$) (Figura 3A e 3B) e também tivemos um número de parasitos significativamente maior quando comparado com TS^{SYN} em cada tempo de infecção (Figura 3B). Por outro lado, nas células TS^{SYN}, o número de parasitos não se alterou significativamente ao longo do tempo.

5.4. Processo de invasão é o primeiro mecanismo de resistência de SYN contra *T. gondii*

Para verificar o número de parasitos capazes de invadir ambas as células, foi realizado o ensaio de invasão, seguido de imunofluorescência para distinguir parasitos intracelulares de extracelulares.

Nossos dados mostram que as células TS^{CYT} tiveram maior número de parasitos intracelulares se comparado com as células TS^{SYN}, sendo ~25 vezes maior baseado nas análises de imagem de fluorescência ($P = 0,0436$) (Figura 4A). Além disso, o número

total de parasitos associados à superfície das células TS^{SYN} foi significativamente menor se comparado às células TS^{CYT} ($P < 0,0243$) (Figura 4B).

5.5. CYT e SYN derivados de células TS^{CT} não produzem CCL22

Para avaliar a resposta das células TSCT em relação a produção de CCL22, foi mensurado a abundância dos transcritos dessa quimiocina e a proteína secretada usando RT-qPCR e ELISA, em células TS^{CYT} e TS^{SYN} *mock* infectadas ou infectadas. Nossos dados mostraram que a abundância dos transcritos de CCL22 aumentaram ~3 vezes em células TS^{CYT} infectadas, quando comparadas com as células TS^{CYT} *mock* infectadas ($P = 0,05$) (Figura 5A), e nas células TS^{SYN} houve um aumento de ~0,14 vezes se comparado às células TS^{SYN} *mock* infectadas ($P = 0,0178$) (Figura 5B). No entanto, quando mensuramos essa quimiocina no sobrenadante de ambas as células, podemos ver que CCL22 não foi liberado em níveis detectáveis em todas as condições e tipos celulares (Figura 5C e 5D).

5.6. Células TS^{SYN} e TS^{CYT} infectadas com *T. gondii* apresentam uma grande diferença na expressão gênica

Com o objetivo de avaliarmos a diferença de expressão gênica entre as células TS^{CYT} e TS^{SYN} após a infecção, foi realizado o sequenciamento do RNA, e os dados gerados foram analisados inicialmente, usando a Análise de Componente Principal (PCA) para visualizar a integridade dos nossos dados, e para observar as diferenças e similaridades dos transcriptomas de ambas as células hospedeiras após a infecção ou *mock* infecção com *T. gondii*. PC1 englobou 84% da variância total e o tipo de célula (TS^{SYN} ou TS^{CYT}) variou ao longo deste eixo (Figuras 6A). A maior parte da variância restante (13% de 16%) foi englobada pela infecção (Figura 6A). Estes dados confirmam que TS^{CYT}s e TS^{SYN}s são células transcricionalmente distintas. Uma surpresa nesses dados foi a magnitude do impacto da infecção nos transcriptomas de TS^{CYT} e TS^{SYN}, os quais foram praticamente similares entre os tipos celulares, apesar da dramática diferença na infectividade do parasito observada na figura 2A e 2B.

Todos os transcritos e aqueles de abundâncias significativamente diferentes baseados nas análises DESseq2 ($P_{adj} < 0,05$; $|\log_2 \text{fold-difference}| > 2$) estão mostradas nos gráficos MA (razão logarítmica versus abundância média para cada transcrito) (Figura 6B-6D). Como mostrado na figura 6B e 6C, gráficos MA comparando a infecção em ambas as células TS^{SYN} e TS^{CYT} tiveram perfis e formas semelhantes, e números

similares de genes com abundância de transcritos significativamente diferentes (170 e 101, respectivamente). Por outro lado, TS^{SYN} e TS^{CYT} *mock* infectados apresentaram grande número da abundância de transcritos que foram significativamente diferentes (1.047 genes totais; Figura 6D). Estes dados estão consistentes com as informações do gráfico de PCA mostrado na Figura 6A, e indicam que, sob os parâmetros de infecção (número de parasitos e duração) usados nesses experimentos, as diferenças entre os tipos de células no nível de transcrição superaram em muito as causadas pela infecção.

Analisando mais detalhadamente os transcritos que foram alterados em abundância, quando comparamos as células TS^{SYN} e TS^{CYT} *mock* infectadas, TS^{SYN} mostrou 407 genes regulados positivamente e 405 genes regulados negativamente em comparação com TS^{CYT} *mock* infectado (Figura 7A). Além disso, TS^{SYN} infectado mostrou 874 genes regulados positivamente e 954 genes regulados negativamente em relação ao TS^{CYT} infectado (Figura 7B), e a sobreposição entre TS^{SYN} *mock* infectado e TS^{CYT} *mock* infectado e TS^{SYN} infectado e TS^{CYT} infectado foi 2.032 genes regulados positivamente e 2117 regulados negativamente ($\log \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 ; $P < 0,01$) (Figura 7B). Nós também analisamos a extensão da sobreposição entre os transcritos de diferentes abundâncias após a infecção de TS^{SYNs} e TS^{CYT}s. Estes dados mostraram que nas células TS^{SYN}, 101 genes foram regulados positivamente e 6 genes regulados negativamente após a infecção (Figura 7B), por outro lado, quando as células TS^{CYT} foram infectadas, elas tiveram 152 genes regulados positivamente e 98 regulados negativamente (Figura 7B) e a sobreposição de 119 genes regulados positivamente e 4 genes regulados negativamente por ambas as células infectadas (Figura 7A) ($\log \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1 ; $P < 0,01$). Esses dados mostram que mesmo com baixa taxa de infecção e proliferação de *T. gondii* em células TS^{SYN}, estas células apresentaram grandes alterações no transcriptoma, levando a uma grande modulação de genes (Figura 7A e 7B).

Uma característica única do SYN é sua capacidade de resistir à infecção por *T. gondii* (ANDER et al., 2018; ROBBINS et al., 2012) sem exposição prévia a citocinas ativadoras como o IFN- γ . Dado que as células TS^{SYNs} recapitulam este fenótipo, nosso objetivo foi identificar genes de resistência das células hospedeiras que podem ser expressos constitutivamente em TS^{SYNs} em comparação com TS^{CYT}s e outros tipos de células suscetíveis, ou induzidos pela infecção por *T. gondii* exclusivamente em TS^{SYNs}. O gráfico de calor ilustra genes envolvidos em respostas pró-inflamatórias ou autofágicas que foram altamente expressos nas células TS^{SYN} em ambas as condições, *mock* infectadas e infectadas, como *PAPPA*, *CARD17*, *TICAM2*, *NOS3*, *ISG20*, *MAK8*, *IP2*, *MAP1LC3B*,

LAMP3, *ATG13*, *CAPSP1P2*, *CASP4*, *IL16*, *EIF2AK2* e *IFITM2*. Por outro lado, interessantemente, *SI00A4* e *CCL11* apenas foram induzidos positivamente nas células TS^{SYN} após a infecção por *T. gondii* (Figura 7C).

5.7. Vias relacionadas ao metabolismo como glicólise, fosforilação oxidativa e adipogênese foram moduladas negativamente nas células TS^{SYN}

Após avaliarmos os dados em relação ao número de genes modulados em ambas as células após a infecção, o próximo passo foi avaliar conjuntos de genes que tiveram scores enriquecidos negativamente e positivamente nas condições testadas utilizando o programa GSEA, através de um banco de dados do genoma humano. Nossos resultados mostraram 18 conjuntos de genes que foram significativamente modulados em células TS^{SYN} em relação às células TS^{CYT} *mock* infectadas, e 15 conjuntos de genes na condição de células TS^{SYN} infectadas/TS^{CYT} infectadas (*FDR-q value* < 0,01) (Figura 8A). Adicionalmente, foram identificados conjuntos de genes muito interessantes que foram modulados negativamente apenas nas células TS^{SYN}, como ponto de verificação G2M, junção apical, glicólise e via P53 (Figura 8A). Após a infecção, alguns conjuntos de genes foram regulados positivamente em células TS^{SYN}, como sinalização de IL-2 STAT5, sinalização MTORC1 e sinalização PI3K AKT MTOR (Figura 8A). Além do mais, a condição TS^{SYN} infectado/TS^{SYN} *mock* infectado apresentou 17 conjuntos de genes, enquanto que TS^{CYT} infectado/TS^{CYT} *mock* infectado exibiu 19 conjuntos de genes (*FDR-q value* < 0, 01) (Figura 8B). Vias muito interessantes enriquecidas negativamente, como reparo de DNA, adipogênese, alvos E2F e junção apical foram identificadas após a infecção de células TS^{SYN} com *T. gondii* (Figura 8B). As vias MYC alvos v2 apenas foi ativada após a infecção de células TS^{CYT} (Figura 8B), enquanto que MYC alvos v1 e fosforilação oxidativa foram reguladas negativamente nas células TS^{SYN} após a infecção pelo parasito e moduladas positivamente nas células TS^{CYT} (Figura 8B).

5.8. *T. gondii* apresentou grandes mudanças no transcriptoma genômico quando associados às células TS^{CYT} e TS^{SYN}

Após analisar os transcriptomas das células hospedeiras, mapeamos o genoma de *T. gondii* e procuramos diferenças na expressão gênica em parasitos que infectaram células TS^{CYT} e TS^{SYN}. Nossos dados mostraram que os parasitos associados às células TS^{CYT} e TS^{SYN} apresentam diferenças na expressão gênica. Isto é amplamente visível no gráfico de PCA mostrado na Figura 9A, indicando que a expressão gênica de *T. gondii*

variou ao longo do eixo definido pelo tipo de célula que eles foram usados para infectar. O gráfico MA na Figura 9B mostra claramente que a maior parte dos genes significativamente variáveis eram aqueles que eram de maior abundância em parasitos que infectaram TS^{CYT}s em comparação com TS^{SYN}s. Isso pode ter ocorrido devido ao aumento da atividade transcricional e/ou estabilidade dos transcritos do parasito em TS^{CYT}s em comparação com aqueles que infectaram as células TS^{SYN}s, possivelmente devido à alta taxa de replicação neste tipo celular em comparação com TS^{SYN}.

Para fornecer uma análise mais detalhada das diferenças na abundância de transcritos entre TS^{CYT}s e TS^{SYN}s executamos os conjuntos de genes de vias KEGG previamente listados (CROKEN et al., 2014) no programa GSEA. Nossos dados revelaram que todas as vias relacionadas ao metabolismo foram enriquecidas positivamente em TS^{CYT}s em comparação com TS^{SYN}s. Vias relacionadas à replicação do parasito, estão entre estes conjuntos de genes, como *ribossomo*, *proteassoma*, *replicação de DNA*, *biossíntese de ácidos graxos e glicólise/gliconeogênese* ($FDR-q \text{ value} < 0,05$) (Figura 9C). Dentre essas vias metabólicas, um *cluster* de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos mostrou resultados muito interessantes, pois houve uma baixa abundância desses transcritos em parasitos que haviam infectado e/ou estavam associados às células TS^{SYN} como é mostrado no mapa de calor ($FDR-q \text{ value} < 0,05$) (Figura 9D). Destacamos os genes que codificam as seguintes enzimas, a *proteína contendo domínio de acil transferase (AT)* (TGME49_225990), *proteína transportadora beta-hidroxiacil-acil desidratase (FabZ)* (TGME49_321570), *enol-acil redutase (ENR)* (TGME49_251930), *3-cetoacil- (acil-carreador-proteína) redutase (FabG)* (TGME49_217740), *3-oxoacil-acil-carreadora proteína sintase I/II, putativa (FABF)* (TGME49_293590), *acetil-CoA carboxilase ACC1* (TGME49_221320) e *proteína transportadora beta-cetoacil-acil sintase III, putativa (FabH)* (TGME49_231890) que são genes que pertencem a via da *síntese de novo* (FAS II) que ocorre no apicoplasto do parasito.

6. DISCUSSÃO

As células sinciciotrofoblásticas são conhecidas por serem bastante resistentes à infecção por *T. gondii*, mas os mecanismos envolvidos na restrição do crescimento do parasito nessas células, ainda não estão claros (ARORA et al., 2017). Para elucidá-los, inicialmente, propusemos investigar se as células TS^{CT} poderiam recapitular a sensibilidade das células PHT após a infecção por *T. gondii*, uma vez que o citotrofoblasto derivado da cultura primária é mais susceptível e o sinciciotrofoblasto mostrou ser muito resistente à infecção por *T. gondii*. Para isso, nós cultivamos as células TS^{CT} e as diferenciamos em TS^{SYN} (3D). Com os nossos resultados, podemos concluir que fomos capazes de reproduzir TS^{CYT} e TS^{SYN} conforme descrito anteriormente por Okae e colaboradores (2018), uma vez que nossos resultados demonstraram que TS^{CYT} foi positivo para ITGA-6 e negativo para SDC-1 e CGB, enquanto TS^{SYN} foi positivo para SDC-1 e CGB e negativo para ITGA-6. De acordo com estudos prévios, sugere-se que a expressão dos genes CGB e SDC-1 são excelentes indicadores de sincialização, pois as células sinciciotrofoblásticas são altas produtoras do hormônio gonadotrofina coriônica (AZAR et al., 2018), e expressam SDC-1 na superfície apical das mesmas (JOKIMA et al., 1998).

Posteriormente, nós avaliamos se as células TS^{CT} responderiam à infecção por *T. gondii*, assim como as células PHT. Nossos dados mostraram que as células TS^{SYN} 3D foram capazes de restringir o crescimento do parasito após 24h de infecção, enquanto que as células TS^{CYT} foram mais susceptíveis. Estes dados corroboram com estudos prévios que demonstraram que as células SYN foram muito resistentes à infecção por *T. gondii*, já que o parasito não se replicou em células SYN derivadas das células PHTs de placenta a termo (ABBASI et al., 2003; ANDER et al., 2018). Em contrapartida, os parasitos conseguiram se replicar rapidamente nas células CYT, e o mesmo fenômeno foi observado em vilos placentários oriundos de placentas de segundo trimestre de gestação (ABBASI et al., 2003; ANDER et al., 2018). Além disso, outro estudo utilizando vilos de primeiro trimestre mostrou que SYN atua como uma forte barreira contra *T. gondii*, uma vez que essas células foram muito resistentes à infecção (ROBBINS et al., 2012).

Pela primeira vez, pudemos avaliar a taxa de replicação do parasito durante 48h e 72h pós-infecção em um modelo celular de SYN altamente semelhante às células PHT. Nossos resultados mostraram que *T. gondii* não foi capaz de crescer em TS^{SYN}, mesmo com um tempo maior de infecção, confirmando que essas células possuem mecanismos para restringir a replicação do parasito. Por outro lado, as células TS^{CYT} foram muito

susceptíveis à infecção, uma vez que o parasito se replicou intensamente e de forma dependente ao longo do tempo. Dessa forma, o uso de TS^{CT} torna essas células uma grande vantagem no estudo da transmissão congênita se comparadas às células PHT.

Além das células PHT, algumas linhagens celulares, como BeWo, JEG-3 e JAR são comumente usadas como modelos experimentais de trofoblasto para o estudo da transmissão vertical de muitos patógenos, incluindo *T. gondii* (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; MCCONKEY et al., 2016; ANDER et al., 2018). Estas células expressam marcadores para trofoblasto, como citoqueratina-7 (KRT7) (MALDONADO-ESTRADA et al., 2004), mas elas não se tornam SYN espontaneamente, por isso é necessário o uso de reagentes que aumentem de cAMP, o qual é responsável por mediar a fusão de CYT e formar células multinucleadas semelhantes a SYN (WICE et al., 1990). Mesmo quando as células foram sincicializadas, formando células semelhantes a SYN, muitos estudos têm mostrado que elas não apresentaram a mesma sensibilidade à infecção por *T. gondii* se comparado às células PHT (DELORME-AXFORD et al., 2013; MCCONKEY et al., 2016; ANDER et al., 2018). Por outro lado, um estudo demonstrou que quando JEG-3 foi cultivada em um sistema tridimensional em biorreator e co-cultivada com células endoteliais humanas, elas se fundiram espontaneamente para formar SYN, e exibiram um fenótipo de resistência à infecção por *T. gondii* similar ao que ocorre com as células PHT (MCCONCKEY et al., 2016). Embora PHT seja um ótimo modelo de trofoblasto, elas apresentam muitos fatores limitantes, como vida curta em cultura, o que dificulta a realização de longos experimentos para avaliar o curso da infecção em células SYN e CYT, além do mais, estas células não podem ser geneticamente modificadas (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). Assim, dada a similaridade nos transcriptomas e metilomas (~ 99% de similaridade) entre as células TS^{CT} e as células PHT (OKAE et al., 2018), em conjunto com os resultados encontrados no nosso estudo, em que mostramos que é possível de se realizar experimentos que exijam um maior tempo em cultura e que TS^{SYN} é resistente à infecção por *T. gondii* de maneira similar às células PHT, podemos sugerir que TS^{CT} representa uma ótima alternativa como modelo celular para entender os mecanismos envolvidos na susceptibilidade e resistência de células trofoblásticas à infecção por *T. gondii*.

Muitos estudos mostraram que as células SYN, além de restringirem o crescimento de diversos microrganismos, também foram descritas como resistentes à invasão por muitos patógenos, incluindo *T. gondii*. Alguns estudos mostraram que SYNs não possuem junções intercelulares, o que dificultaria a invasão, pois muitos patógenos

usam essas moléculas para invadir as células (OCKLEFORD et al., 1981; ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012). Também foi descrito que estas células apresentam uma rede de citoesqueleto e microvilosidades ramificadas que podem inibir a entrada dos patógenos (CANTLE et al., 1987). Então, nós investigamos se TS^{SYN} 3D derivado de TS^{CT} seriam mais resistentes aos processos de invasão do parasito em relação às células TS^{CYT}. Observamos que as células TS^{SYN} apresentaram um menor número de parasitos aderidos à superfície celular e também uma menor taxa de parasitos que invadiram essas células. Por outro lado, as células TS^{CYT} apresentaram mais parasitos aderidos à superfície celular e conseqüentemente, mais parasitos invadiram essas células. Com esses resultados, podemos comprovar que o TS^{SYN} restringe fortemente a invasão de *T. gondii*, sugerindo a ideia de que o primeiro mecanismo de resistência das células SYN contra patógenos é evitar a invasão de parasitos (ROBBINS; BAKARDJIEV, 2012). Embora os mecanismos envolvidos na resistência à adesão e invasão nas células TS^{SYN} não estejam bem elucidados, acreditamos que TS^{SYN} possa ter microvilosidades ramificadas, uma vez que estão em conformação 3D, mas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) devem ser realizadas para comprovar isso. Além disso, os dados de RNA-seq mostraram que TS^{CYT} possuem mais transcritos de HSPG2 e ICAM-1 do que TS^{SYN} 3D (dados não mostrados). Ambas as moléculas estão envolvidas na adesão e invasão de *T. gondii* às células hospedeiras alvo, uma vez que proteínas específicas, como SAG-3 e MIC-2, do parasito podem se ligar a HSPG e ICAM-1, respectivamente (JACQUET et al., 2001; BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005).

Após avaliar a susceptibilidade das células TS^{CYT} e TS^{SYN}, nosso objetivo foi avaliar a produção de CCL22 após a infecção por *T. gondii* em ambas as células. Um estudo mostrou que as células PHT respondem à infecção por *T. gondii* aumentando o número de transcritos de CCL22 em torno ~ 400 vezes mais se comparado com as células *mock* infectadas quando houve a infecção com parasitos vivos, sugerindo que a invasão é requerida para a produção de CCL22 (ANDER et al., 2018). Embora a produção da quimiocina pelas células PHT tenha sido expressiva, não foi possível distinguir qual célula estava envolvida nessa produção, ou seja, não foi possível avaliar se CYT ou SYN ou as duas populações foram responsáveis pelos altos níveis de CCL22 após a infecção por *T. gondii*. Dessa maneira, nós dosamos os níveis de CCL22 nas células TS^{CT} e nossos dados mostraram que TS^{CYT} e TS^{SYN} tiveram um pequeno aumento nos níveis de expressão gênica após a infecção, mas quando analisamos a liberação da quimiocina no sobrenadante, os níveis de CCL22 não foram detectados em ambas as células, tanto

infectadas quanto *mock* infectadas. Com esses resultados, podemos sugerir que células TS derivadas da placenta do primeiro trimestre não são capazes de liberar CCL22 em resposta à infecção por *T. gondii* quando comparadas com o fenótipo das células PHT, e fornece evidências adicionais de que a indução de CCL22 não é relevante para restringir a invasão e crescimento do parasito em células SYN que se desenvolvem após a cultura de PHTs ou TS^{SYNs}. Por outro lado, alguns genes como *PAPPA*, *TICAM2*, *CARD17*, *IL16*, *MAP1LC3B*, *ATG3* e *NOS3* que estão envolvidos na resposta pró-inflamatória ou autofágica, foram encontrados com alta expressão em TS^{SYNs} se comparado com TS^{CYT}s, em ambas as condições, não infectados e infectados, e os transcritos *S100A7A* e *CCL11* foram apenas induzidos quando as células TS^{SYN} foram infectadas. Esses dados sugerem uma variedade de genes que devem ser investigados para entender se estes podem estar relacionados à resistência de TS^{SYNs} contra *T. gondii*.

TS^{CYT} e TS^{SYN} são populações de trofoblastos completamente diferentes e também respondem à infecção por *T. gondii* de maneira diferente. Uma grande vantagem de se trabalhar com as células TS^{CT} é a possibilidade de desenvolver estudos usando as células TS^{CYT} e TS^{SYN} separadamente para entender os mecanismos que são ativados ou regulados negativamente em cada uma das células após a infecção com o parasito, usando por exemplo a técnica de RNA-seq, que nos proporciona uma oportunidade única de comparar os perfis transcricionais entre células TS^{CYT} e TS^{SYN}. Nossos dados mostraram uma grande diferença na expressão gênica entre as duas células. Interessantemente, embora tenha sido visto uma baixa taxa de invasão e proliferação de *T. gondii* nas células TS^{SYN}, podemos notar que a presença do parasito foi capaz de modular essas células devido ao alto número de genes que foram regulados diferentemente em abundância. A comparação entre os transcriptomas de TS^{CYT} e TS^{SYN} infectados ou *mock* infectados nos proporcionou avaliar de maneira geral as vias positivamente e negativamente em ambas as células infectadas ou não. De maneira geral, *T. gondii* tem um grande impacto na maquinaria das células hospedeiras para a sua sobrevivência (VILLARES; BERTHELET; WEITZMAN, 2020), favorecendo tanto a evasão do sistema imune, quanto a sobrevivência das células hospedeiras e persistência dos parasitos nas mesmas (BOUGDOUR et al., 2013; BRAUN et al., 2019). Nos nossos dados, as vias relacionadas com ciclo celular e metabolismo foram predominantemente alteradas em ambas as células, infectadas ou *mock* infectadas. Em relação à progressão do ciclo celular, as vias alvo E2F, ponto de verificação G2M e MYC alvos v1 apresentaram escores de enriquecimento negativos nas células TS^{SYN} se comparado com as células TS^{CYT} *mock*

infectadas, corroborando com o perfil das células TS^{SYN}, conhecido por serem células diferenciadas terminais não proliferativas (KLIMAN et al., 1986; GERBAUD; PIDOUX, 2015). Interessantemente, quando estas células foram infectadas com *T. gondii*, este perfil não foi alterado nas células TS^{SYN}, sugerindo que o parasito não foi capaz de subverter a maquinaria das células TS^{SYN} para sobreviver. Já quando avaliamos as células TS^{CYT} infectadas, a infecção levou à regulação positiva nas vias MYC alvos v1 e v2 nas células TS^{CYT}. Um estudo mostrou que *T. gondii* pode regular positivamente a transcrição de c-Myc possivelmente como uma estratégia para prevenir apoptose das células hospedeiras, prolongando a sobrevivência das mesmas para garantir o seu nicho intracelular (FRANCO; SHASTRI; BOOTHROYD, 2014). Assim, podemos sugerir que uma das maneiras que *T. gondii* usa para conseguir proliferar nas células TS^{CYT} seria a ativação das vias MYC, favorecendo os nutrientes necessários para a sua sobrevivência. Em contrapartida, nas células TS^{SYN} as vias MYC permanecem reguladas negativamente mesmo na presença do parasito, e esse fenótipo poderia ser um mecanismo de resistência à replicação do parasito, pois não beneficia a sobrevivência de *T. gondii* nas células hospedeiras.

Algumas vias relacionadas ao metabolismo como glicólise, fosforilação oxidativa e adipogênese, também foram moduladas negativamente nas células TS^{SYN} mesmo após a infecção por *T. gondii*. De acordo com a literatura, as células SYN e CYT têm sido descritas como população de trofoblastos que apresentam vias metabólicas complementemente diferente umas das outras. Embora SYN desempenhe um papel importante durante a gestação, exigindo uma grande quantidade de energia, estudos realizados em células PHT revelaram que a taxa metabólica nas células SYN é muito mais baixa se comparado às células CYT, indicando níveis mais baixos das vias da glicólise e respiração mitocondrial (BAX; BLOXAM, 1997; KOLAH; VALENT; THORNBURG, 2017). Estudos também mostraram que durante o processo de diferenciação de células PHT de CYT para SYN houve uma diminuição significativa do teor de ácidos graxos na fração lipídica total, mostrando que nas células sincicializadas há uma diminuição na captação de ácidos graxos e/ou síntese *de novo* se comparados às células CYT (FERCHAUD-ROUCHER et al., 2017). Similar a esta ideia, outro trabalho usando um fluorescente análogo de ácidos graxos de cadeia longa, BODIPY-C₁₂, aponta que CYT é capaz de esterificar rapidamente e sintetizar ácidos graxos se comparado ao SYN, além de demonstrar que durante o processo de sincicialização ocorre uma diminuição da quantidade de corpos lipídicos nessas células (KOLAH et al., 2016). Sabemos que *T. gondii* além de alterar o ciclo

celular da célula hospedeira, pode regular o metabolismo das células infectadas para aumentar a aquisição de nutrientes, incluindo lipídeos, glicose e outras moléculas para gerar energia, que irão afetar diretamente a sua replicação e sobrevivência (BLUME; SEEBER, 2018). Em específico, estudos mostraram que *T. gondii* não consegue produzir determinados tipos de lipídeos essenciais para sua manutenção, e por isso, o parasito desenvolveu estratégias para explorar tais recursos das células hospedeiras (PERNAS et al., 2017; NOLAN; ROMANO; COPPENS, 2017; BLUME; SEEBER, 2018). Células infectadas são reportadas por terem um aumento do número de corpos lipídicos e os parasitos por sua vez, podem mobilizar os lipídeos presentes nessas organelas para o vacúolo parasitóforo e sua diminuição pode prejudicar a sobrevivência do parasito nas células hospedeira (NOLAN; ROMANO; COPPENS, 2017). Assim, de acordo com nossos dados, podemos sugerir que a diminuição das vias de ácidos graxos, glicólise e da fosforilação oxidativa nas células TS^{SYN} podem gerar um ambiente de estresse para o parasito, pois há uma diminuição de recursos que são essenciais à sua sobrevivência, impedindo o seu crescimento.

Similarmente aos resultados do transcriptoma das células hospedeiras, o transcriptoma de *T. gondii* também evidenciou escores negativos em diversas vias metabólicas extremamente importantes para a replicação e crescimento em parasitos oriundos de células TS^{SYN}, e positivos, de células TS^{CYT}. Corroborando com os dados de parasitismo na figura 1D-E, a via de replicação do DNA apresenta um escore negativo em parasitos que infectaram as células TS^{SYN}, evidenciando que há uma diminuição na transcrição gênica relacionados ao crescimento do parasito nas células TS^{SYN} e aumento dessas vias em parasitos provenientes de células TS^{CYT}. Interessantemente, quando avaliamos um cluster de genes da síntese de ácidos graxos, observamos que os genes ENR, FabZ, FabG, FabF, ACC1 e FabH tiveram uma diminuição na abundância dos transcritos. Esses genes em específico, são descritos por serem responsáveis pela biosíntese *de novo* de ácidos graxos (FAS II) que ocorre majoritariamente no apicoplasto do parasito (WALLER et al., 1998; JELENKA et al., 2001; RAMAKRISHNAN et al., 2012), e muitos estudos tem reportado a importância dessas enzimas como essenciais para a sobrevivência nas células hospedeiras, uma vez que a inibição destas enzimas usando compostos químicos ou modificações genéticas prejudicou o crescimento intracelular de *T. gondii* (JELENKA et al., 2002; MAZUMDAR et al., 2006; RAMAKRISHNAN et al., 2012). Mazumbar e colaboradores (2006) demonstraram que a depleção de ACP, uma proteína essencial para as enzimas da via de FAS II afeta diretamente o crescimento de

T. gondii em cultura celular e a contínua supressão dessa proteína levou à morte do parasito. Diante desses resultados, podemos sugerir que os parasitos que infectaram ou estavam associados às células TS^{SYN} tiveram uma privação de lipídeos pelos dois principais mecanismos usados por esses parasitos para a obtenção de ácidos graxos, seja pelo metabolismo das células TS^{SYN}, que tiveram uma regulação negativa da via da adipogênese, restringindo os recursos lipídicos que são absorvidos pelos parasitos, e pela diminuição da produção dos próprios lipídeos pela via de FAS II, já que as enzimas responsáveis por essa via sofreram uma regulação negativa.

Por fim, diante de todos os resultados encontrados, sugerimos que células TS^{CT} conferem um promissor modelo para o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência das células SYN contra *T. gondii*. E em conjunto, nossos dados mostraram que o TS^{SYN}, uma célula não proliferativa, com baixo metabolismo e baixa produção de nutrientes essenciais utilizados por *T. gondii* pode conferir ao parasita um ambiente estressante que não permite o seu crescimento intracelular. Ainda, podemos observar que embora o parasito seja capaz de modular a maquinaria da célula hospedeira para aumentar o metabolismo da mesma ao seu favor, isso não é observado em células TS^{SYN}. Mas vale ressaltar que acreditamos que diversos outros mecanismos estejam envolvidos na restrição do crescimento de *T. gondii* pelas células TS^{SYN} e mais estudos são necessários para avaliar as diferenças entre produção de citocinas e fatores de transcrição entre essas células TS^{CYT} e TS^{SYN} infectadas com *T. gondii*.

7. CONCLUSÕES

- A mensuração dos marcadores de CYT (ITGA-6) e SYN (CBG e SDC-1) mostraram que as células TS^{SYN} foram diferenciadas com sucesso a partir de TS^{CYT}.
- TS^{SYN} foi capaz de recapitular a sensibilidade de SYN derivadas de células PHT, apresentando grande resistência à infecção por *T. gondii*, enquanto que células TS^{CYT} mostraram maior susceptibilidade à infecção.
- *T. gondii* não foi capaz de crescer em células TS^{SYN} ao longo do tempo (48 e 72h), indicando que essas células possuem mecanismos que restringem o crescimento do parasito.
- Células TS^{SYN} apresentaram um menor número de parasitos intracelulares e menor número de parasitos totais associados à superfície celular, indicando que o processo de invasão pode ser o primeiro mecanismo de resistência das células SYN contra *T. gondii*.
- Células TS^{CYT} e TS^{SYN} não foram capazes de produzir CCL22 após a infecção pelo parasito.
- Células TS^{CYT} e TS^{SYN} mostram uma grande diferença na expressão gênica após a infecção por *T. gondii*.
- TS^{SYN} apresentaram grandes alterações no transcriptoma, levando a uma grande modulação de genes, tanto positivamente quanto negativamente.
- As vias relacionadas ao metabolismo como glicólise, adipogênese e fosforilação oxidativa e ciclo celular, como ponto de verificação G2M, MYC V1 foram reguladas negativamente nas células TS^{SYN}, quando comparadas às células TS^{CYT}.
- Parasitos associados ou que infectaram células TS^{CYT} mostraram grande diferença na expressão gênica se comparado com parasitos que infectaram células TS^{SYN}.
- Vias relacionadas ao metabolismo celular foram reguladas negativamente em parasitos que estavam associados ou que infectaram células TS^{SYN}.
- Genes que codificam enzimas essenciais da via FASII pertencentes ao cluster da via da biossíntese de ácidos graxos foram regulados negativamente nos parasitos oriundos de células TS^{SYN}, indicando uma deficiência na produção de lipídeos importantes para a sobrevivência nas células hospedeiras.

FIGURAS

Figura 1

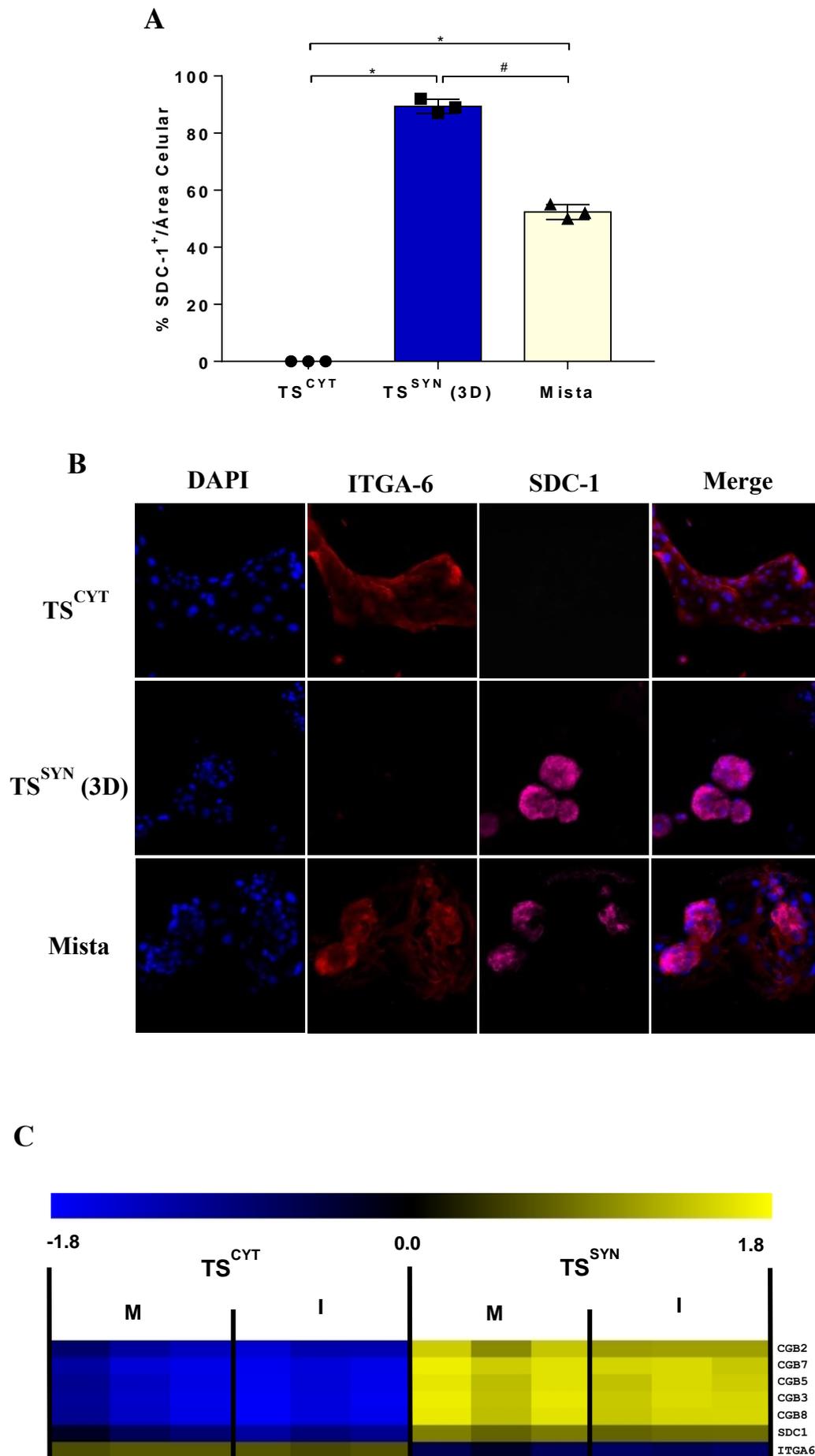
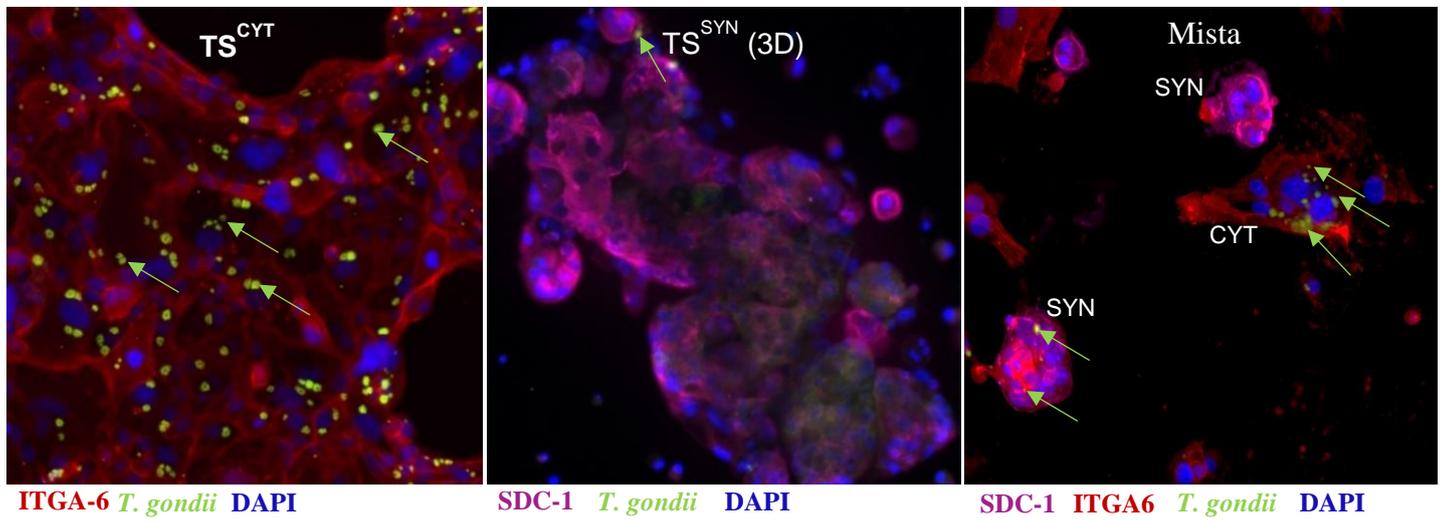


Figura 1: Sucesso de diferenciação de TS^{CYT} em células TS^{SYN} (3D). Células TS^{CYT}, TS^{SYN} (3D) e população mista (TS^{SYN} e TS^{CYT}) foram cultivadas em lâminas de vidro redondas em placa de 24 poços em uma proporção de $2,5 \times 10^4$ e infectadas com 5 parasitos/célula por 24 horas para realizar análises por imunofluorescência. Para o experimento de RNA-seq, as células TS^{CYT} e TS^{SYN} (3D) foram plaqueadas em placas de 6 poços na proporção de $1,5 \times 10^5$ e 1×10^5 , respectivamente. As células foram *mock* infectadas (M) ou infectadas (I) com *T. gondii* na proporção de 5×10^5 parasitos/poço por 24 horas. A imunofluorescência foi realizada para marcar as células com anticorpos específicos anti-SDC-1 para TS^{SYN} (rosa), anti-ITGA-6 para TS^{CYT} (vermelho), e DAPI (azul). **(A)** A quantificação de SDC-1 nas células foi calculada pela porcentagem (%) da expressão de fluorescência de SDC-1 em relação à área celular. As diferenças entre as células foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Bonferroni. * $P < 0,05$ diferenças entre TS^{CYT} e TS^{SYN} 3D, e também entre TS^{CYT} e população mista; # $P < 0,05$ diferença significativa entre população mista e TS^{SYN} 3D. **(B)** Imagens representativas ilustram microscopia de imunofluorescência de TS^{CYT}, TS^{SYN} 3D e população mista TS^{SYN} e TS^{CYT}. **(C)** O mapa de calor demonstra a expressão gênica dos marcadores de TS^{CYT} (ITGA-6) e TS^{SYN} (CGB2, 7, 5, 3, 8 e SDC-1) em células *mock* infectadas e infectadas (*Padj* 0,01; *log fold change* ≥ 2 ou ≤ -2). Para os experimentos de imunofluorescência, foram realizados três experimentos em triplicata, e para o experimento e RNA-seq, foi realizado um experimento em triplicata.

Figura 2

A



B

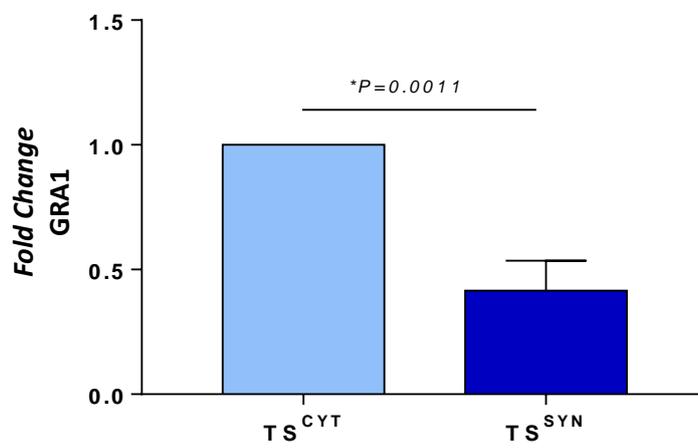


Figura 2: Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* para avaliar susceptibilidade e resistência das células citotrofoblastos e sincitiotrofoblastos. Células TS^{CYT}, TS^{SYN} (3D) e população mista (TS^{SYN} e TS^{CYT}), foram cultivadas em lâminas de vidro redondas em placa de 24 poços em uma proporção de $2,5 \times 10^4$ e infectadas com 5 parasitos/célula por 24 horas para realizar análises de imunofluorescência. Para o experimento de RT-qPCR, as células TS^{CYT} e TS^{SYN} (3D) foram plaqueadas em placas de 6 poços na proporção de $1,0 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$, respectivamente. As células foram *mock* infectadas ou infectadas com *T. gondii* na proporção de 5×10^5 parasitos/poço por 24 horas. **(A)** O ensaio de imunofluorescência ilustra a diferença na proliferação de *T. gondii* (RH-YFP) (verde) na cultura isolada de células TS^{CYT}, TS^{SYN} 3D e na população mista de TS^{CYT} e TS^{SYN}. Setas verdes indicam parasitas intracelulares. **(B)** O índice de proliferação de *T. gondii* foi mensurado pelo ensaio de qPCR usando o gene GRA1 e normalizado com GAPDH como gene de referência, através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (TS^{CYT} vs TS^{SYN}). As diferenças entre TS^{CYT} e TS^{SYN} foram analisadas pelo teste *t*, $*P = 0,0011$. As fotos foram obtidas usando o microscópio de epifluorescência. Escala: 100 μ m. Para os experimentos de imunofluorescência, foram realizados três experimentos em triplicata. Para o experimento de RT-qPCR, foram realizados dois experimentos em triplicata.

Figura 3

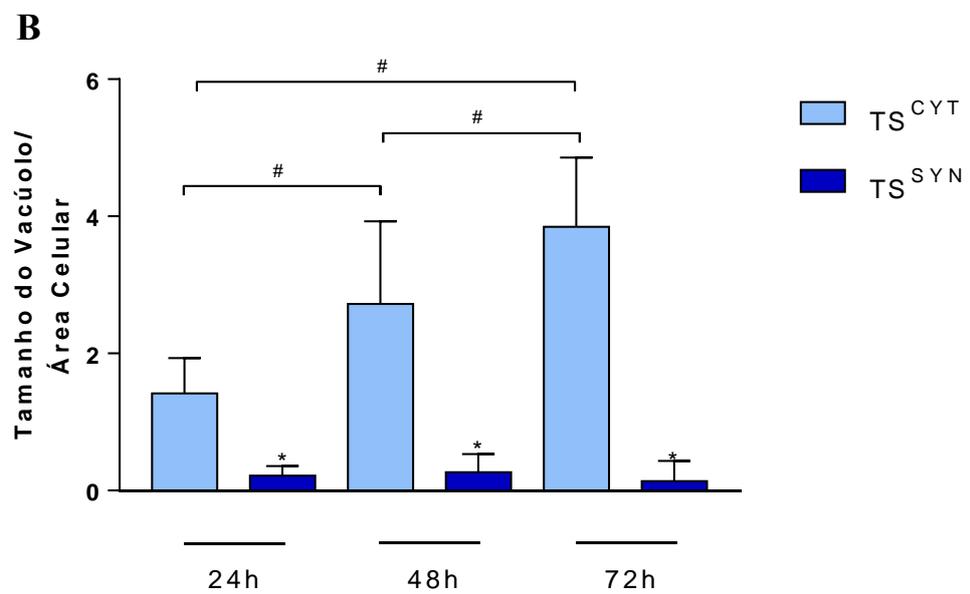
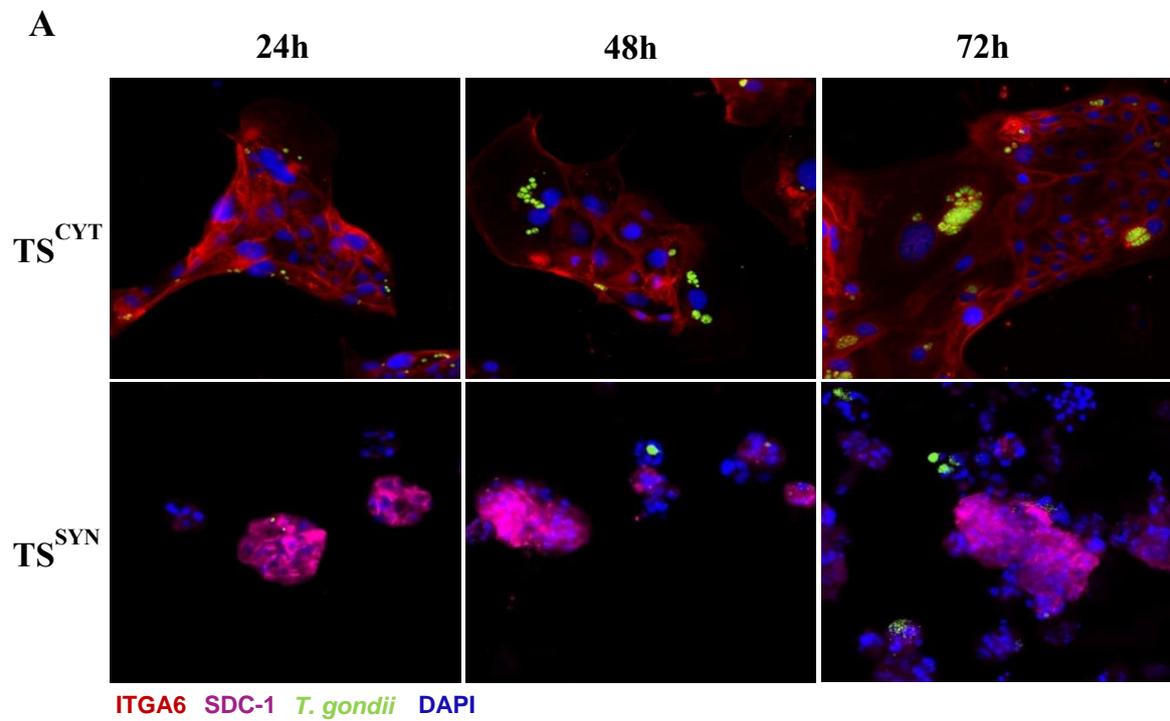
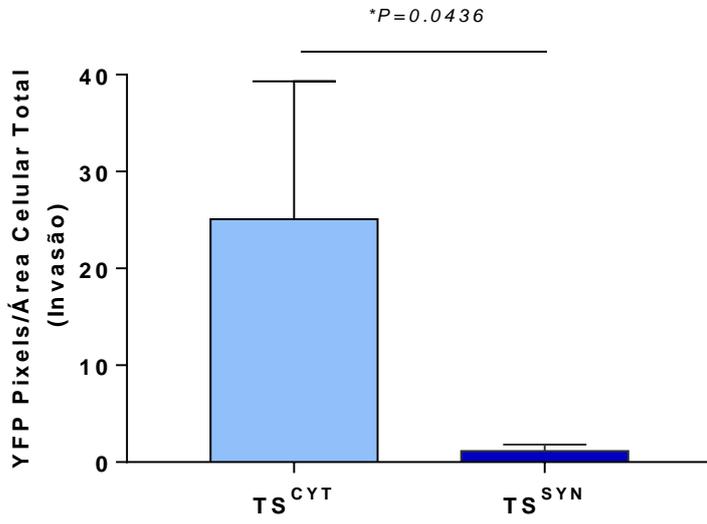


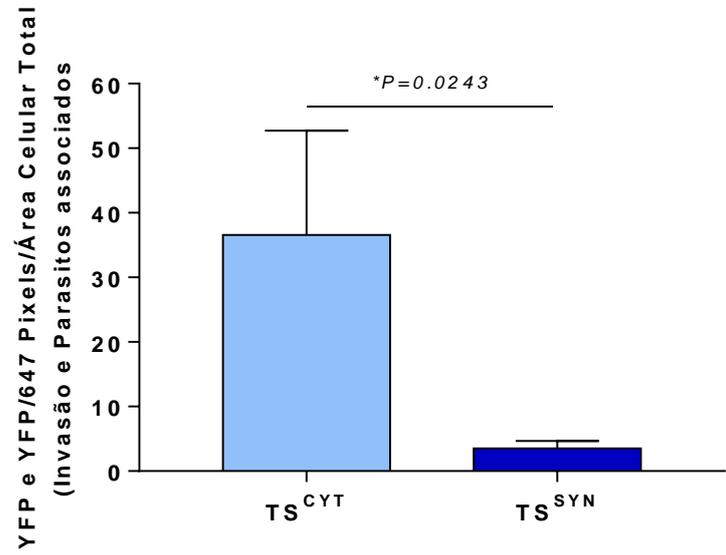
Figura 3: *T. gondii* não foi capaz de crescer em células TS^{SYN} ao longo do tempo. Células TS^{CYT} e TS^{SYN} (3D) foram cultivadas em lamínulas redondas em placa de 24 poços e infectadas nos dias 3 e 5, respectivamente, com *T. gondii* com 1,5 parasito/célula por 24, 48 e 72 horas. As células foram fixadas com PFA 4% e o ensaio de imunofluorescência foi realizado. **(A)** Imagens de imunofluorescência ilustram a evolução da infecção durante 24, 48 e 72h. TS^{CYT} (ITGA-6) é mostrado em vermelho, TS^{SYN} (SDC-1) em rosa, *T. gondii* RH-YFP em verde e DAPI em azul. **(B)** A quantificação da proliferação de *T. gondii* em TS^{CYT} e TS^{SYN} foi calculada pela média do tamanho do vacúolo em cada célula dividido pela área celular em cada tempo estabelecido. As lamínulas foram divididas em quatro campos, e três fotos de campo foram obtidas através do microscópio de epifluorescência (escala: 100 µm.). As imagens foram analisadas usando o *software Image J*. As diferenças entre TS^{CYT} e TS^{SYN} e entre os diferentes tempos de infecção foram analisadas por One-Way ANOVA com teste post-hoc de comparações múltiplas de Bonferroni. * $P < 0,0001$ diferença significativa entre TS^{CYT} e TS^{SYN}; # $P < 0,0001$ diferença significativa da média do tamanho do vacúolo entre os diferentes tempos de infecção em TS^{CYT}. Foram realizados 3 experimentos em triplicata.

Figura 4

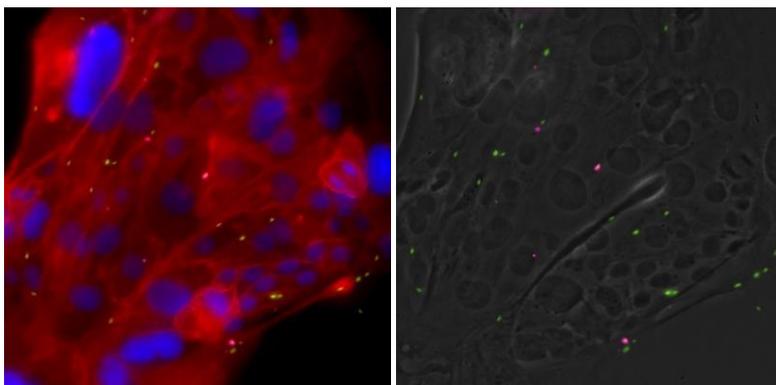
A



B



C

TS^{CYT}ITGA6 *T. gondii*/*T. gondii* DAPI

D

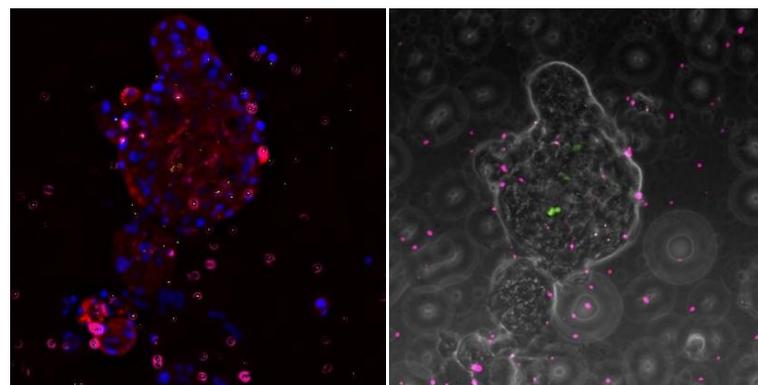
TS^{SYN}SDC-1 *T. gondii*/*T. gondii* DAPI

Figura 4: Invasão de *T. gondii* em células TS^{SYN} e TS^{CYT}. Células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram cultivadas em lâminas redondas de vidro em placas de 24 poços e infectadas com *T. gondii* RH-YFP nos dias 3 e 6, respectivamente, na proporção de 5 parasitos/célula por 2 horas. As células foram fixadas com 4% de PFA e a imunofluorescência foi utilizada para distinguir os parasitas intracelulares dos extracelulares. **(A)** A quantificação da invasão de *T. gondii* em TS^{CYT} e TS^{SYN} foi calculada pelo número de parasitas intracelulares por área celular (YFP⁺/647⁻). As diferenças entre TS^{CYT} e TS^{SYN} foram calculadas pelo teste *t*, **P* = 0,04. **(B)** O total de parasitas associados à TS^{CYT} e TS^{SYN} foi calculado pela soma de parasitas intracelulares (YFP⁺/647⁻) e parasitas extracelulares (YFP⁺/647⁺) por área celular. As diferenças entre TS^{CYT} e TS^{SYN} foram calculadas pelo teste *t*, **P* = 0,02. **(C e D)** Imagens representativas de imunofluorescência do ensaio de invasão em TS^{CYT} e TS^{SYN} mostram TS^{CYT} em vermelho (ITGA-6), TS^{SYN} em vermelho (SDC-1), *T. gondii* em verde (YFP⁺/647⁻; parasitas intracelulares), em verde e rosa (YFP⁺/647⁻ e YFP⁺/647⁺; parasitas intracelulares e extracelulares), azul (DAPI). Para as análises, as lamínulas foram divididas em quatro campos e três fotos de campo foram obtidas com o auxílio do microscópio de epifluorescência. Escala: 100 µm. Foram realizados três experimentos em triplicata.

Figura 5

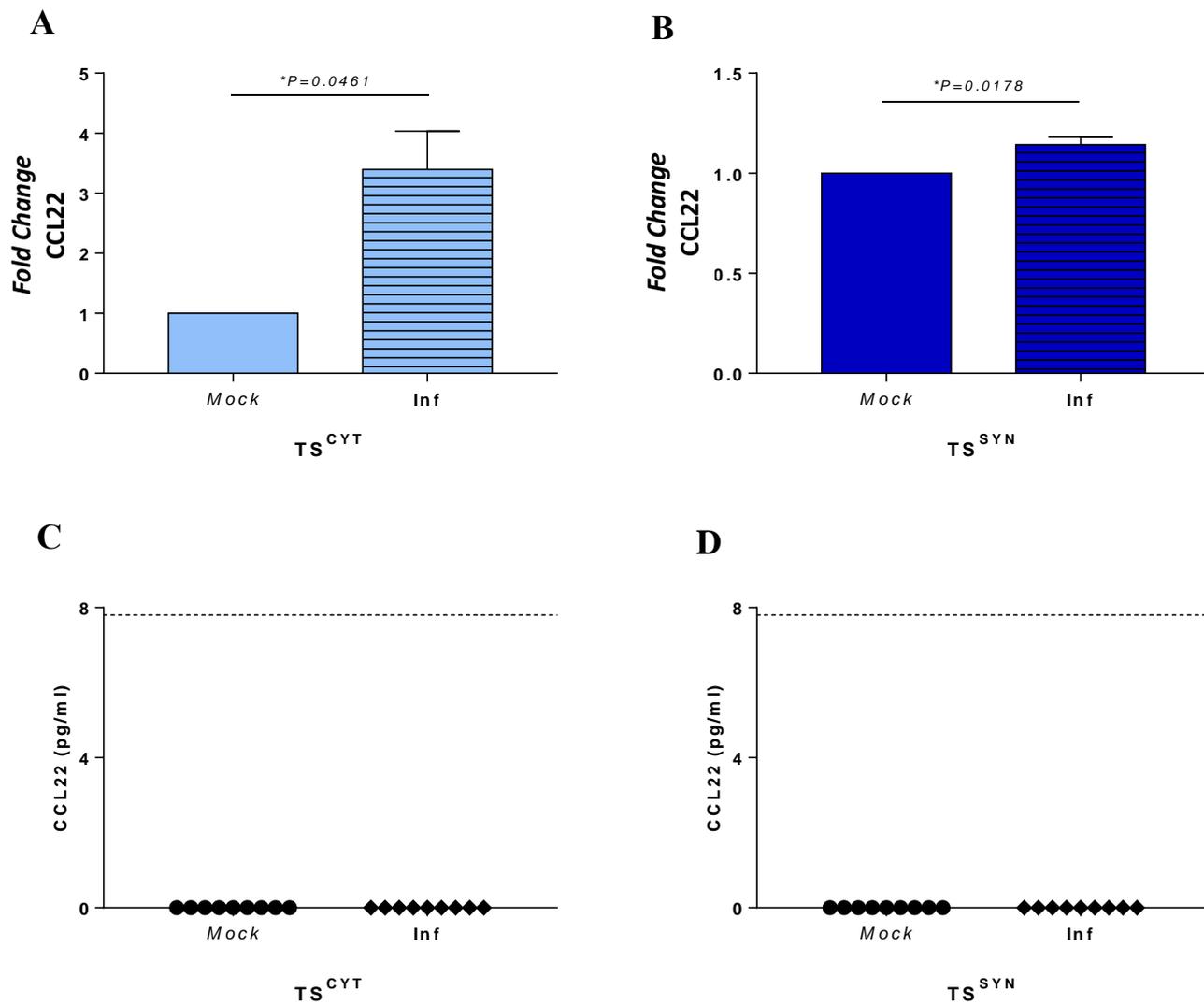
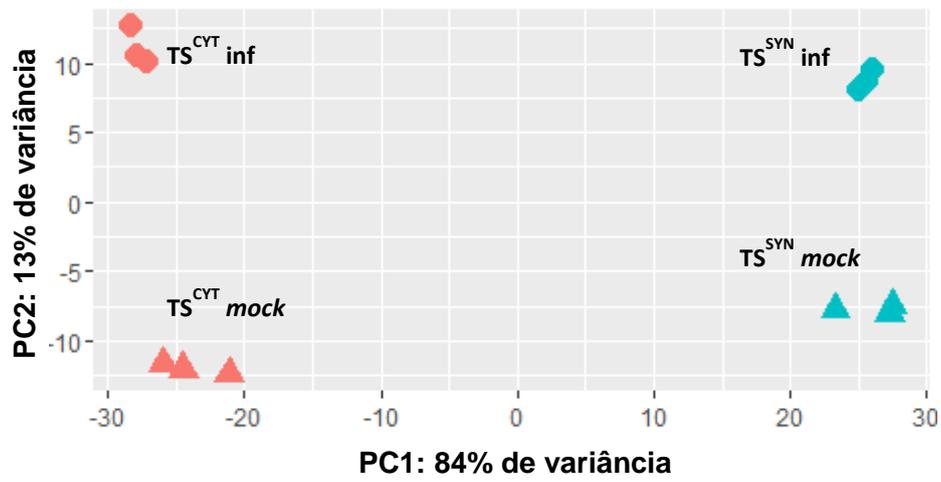


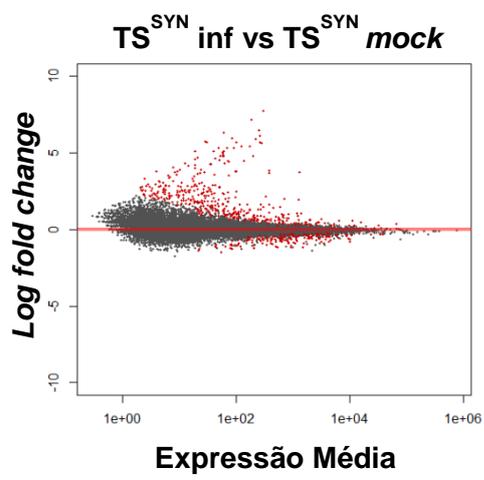
Figura 5. Avaliação de transcritos e produção de CCL22 por TS^{CYT}s e TS^{SYN}s. Células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram cultivadas em placa de 6 poços, *mock* infectadas (*Mock*) ou infectadas (*Inf*) com *T. gondii* no dia 3 e 6, respectivamente, na proporção de 5×10^5 parasitos por poço, por 24 horas. As células e o sobrenadante foram coletados para posterior mensuração de CCL22 por RT-qPCR e ELISA. A expressão gênica de CCL22 foi medida por RT-qPCR e normalizada com GAPDH como gene de referência em (A) TS^{CYT} e em (B) TS^{SYN}, usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (*mock* infectadas vs células infectadas). Os níveis de CCL22 liberado no sobrenadante foram dosados por ELISA em (C) células TS^{CYT} e (D) TS^{SYN} *mock* infectadas ou infectadas com *T. gondii*. Os dados foram expressos em pg/mL, e o limite de detecção foi representado pela linha pontilhada (7,8 pg/mL). As diferenças entre células TS^{CYT} *mock* infectadas com TS^{CYT} infectadas foram calculadas pelo teste *t*, **P* = 0,0461; e entre TS^{SYN} *mock* infectado e TS^{SYN} infectado, **P* = 0,0178. Para o experimento de RT-qPCR, foram realizados dois experimentos em triplicata. Para o ELISA, foram realizados dois experimentos em nonoplicata.

Figura 6

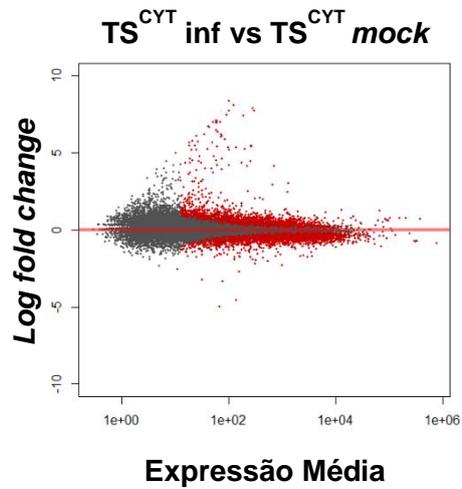
A



B



C



D

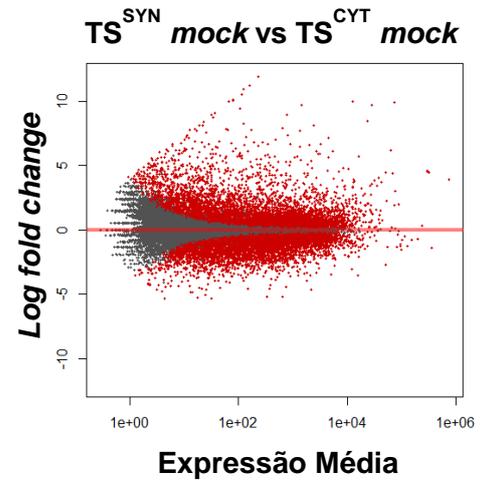
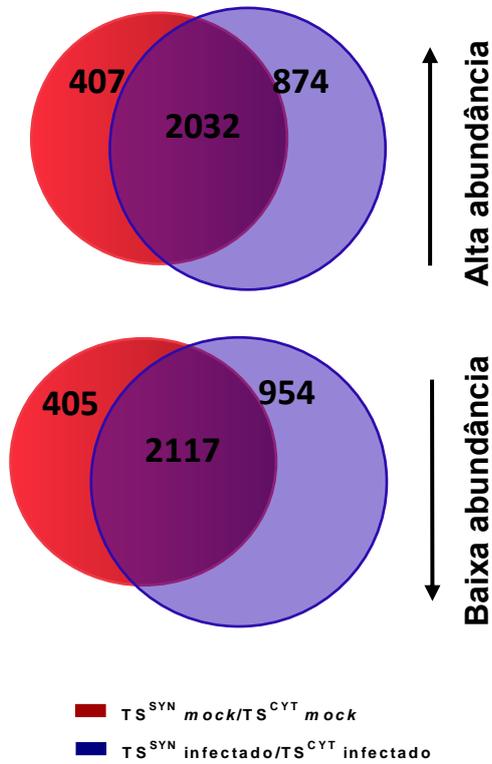


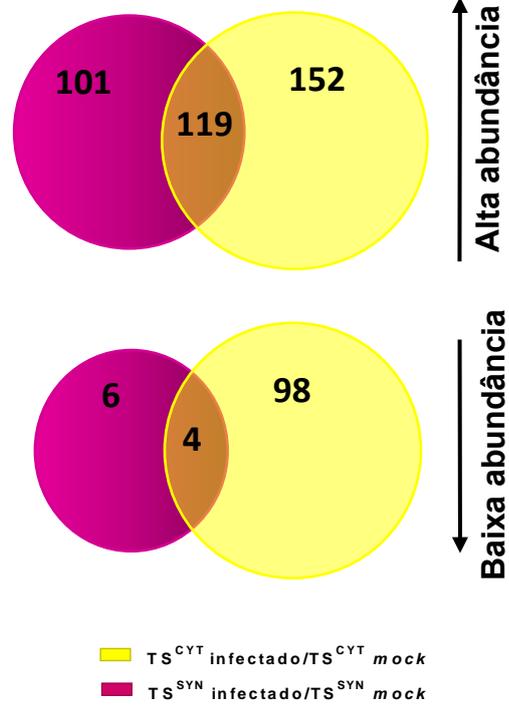
Figura 6. Análise de expressão gênica em células TS^{CYT} e TS^{SYN}. As células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram cultivadas em placa de 6 poços na proporção de $1,0 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$, respectivamente. Foram *mock* infectadas (*mock*) ou infectadas (*inf*) com *T. gondii* no dia 3 e 6, respectivamente, com 5×10^5 parasitos/poço por 24 horas. As células foram coletadas e processadas para sequenciamento de RNA. (A) componentes principais PC1 e PC2 de células TS^{CYT} infectadas (losango laranja) ou *mock* infectadas (triângulo laranja) e células TS^{SYN} infectadas (losango azul) ou *mock* infectadas (triângulo azul). Diferenças entre TS^{CYT} infectado e TS^{SYN} infectado, TS^{CYT} *mock*, e TS^{SYN} *mock* foram analisadas por PC1. Diferenças entre TS^{CYT} infectado e TS^{CYT} *mock*, e TS^{SYN} infectado TS^{SYN} *mock* foram analisadas por PC2. MA-plots mostram a expressão diferencial de genes em TS^{CYT} e TS^{SYN} *mock* infectado e infectado com *T. gondii*. Pontos vermelhos representam genes de abundância diferentemente expressos e os pontos cinzas representam genes que são comuns em (B) TS^{SYN} infectado em comparação com TS^{SYN} *mock* infectado; (C) TS^{CYT} infectado em relação à TS^{CYT} *mock* infectado; (D) TS^{SYN} *mock* infectado em comparação com TS^{CYT} *mock* infectado. Um experimento em triplicata foi realizado.

Figuras 7

A



B



C

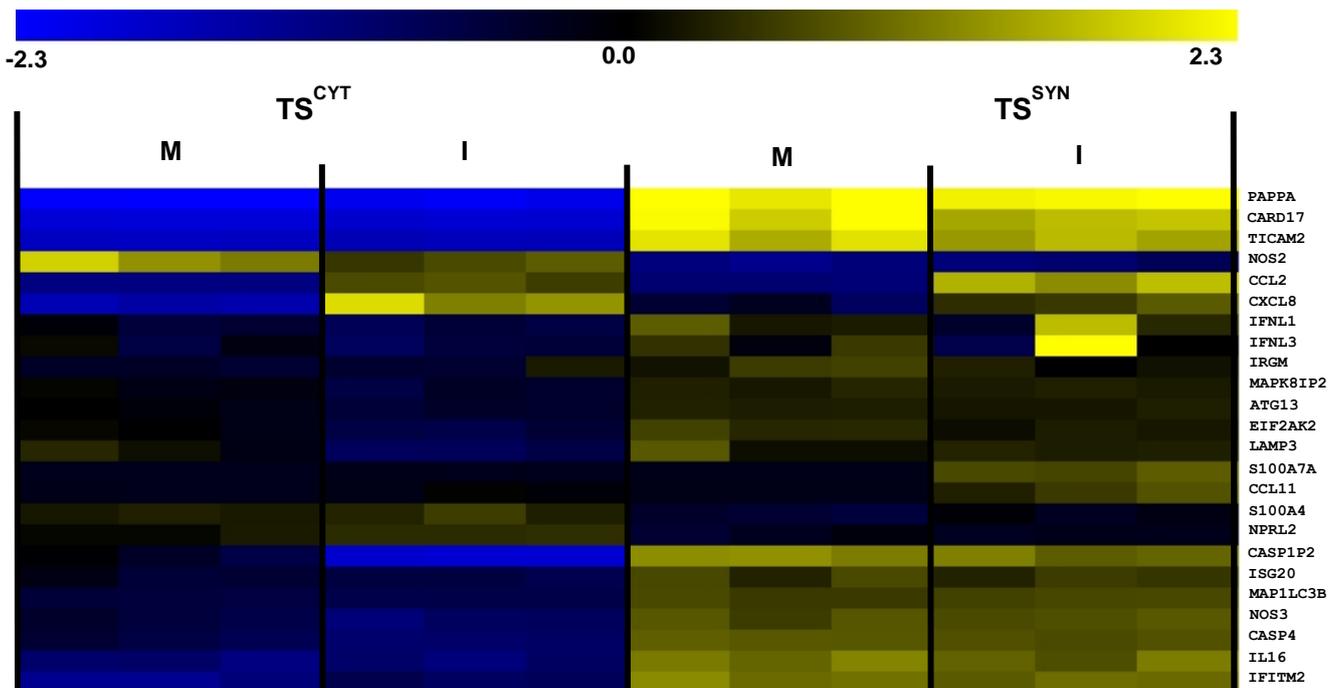
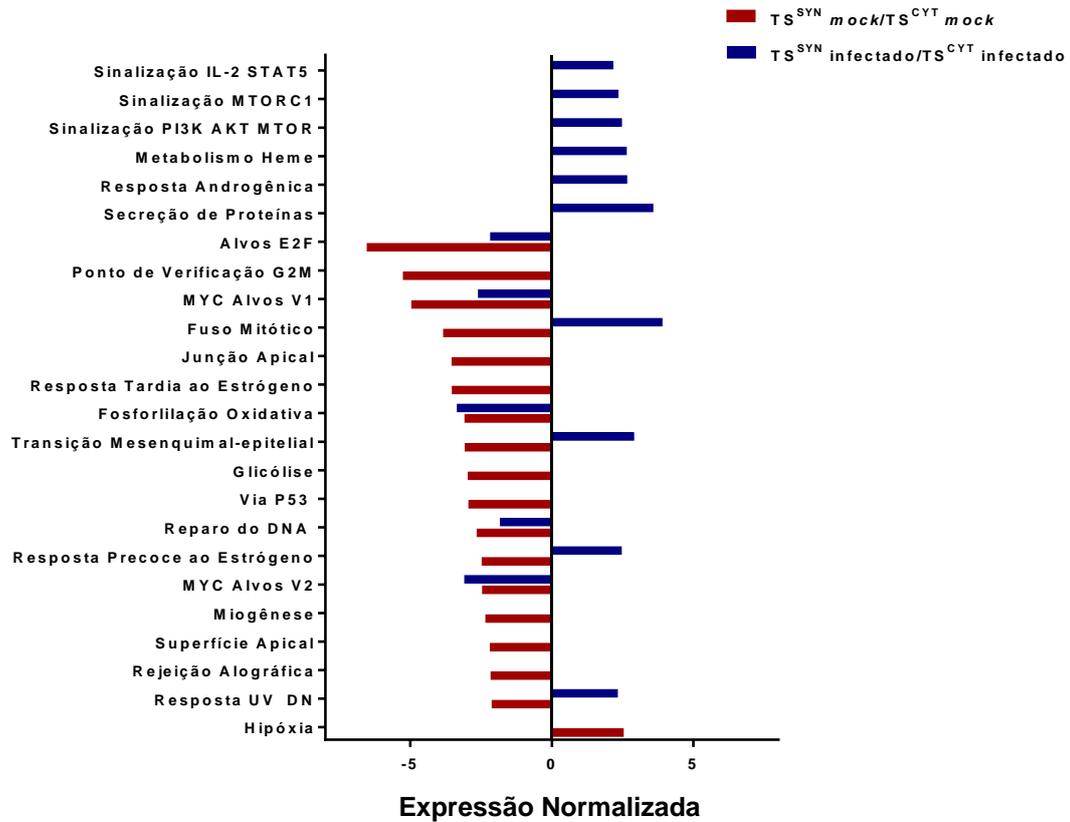


Figura 7: Abundância de transcritos em células TS^{SYN} e TS^{CYT} *mock* infectadas ou infectadas. Diagramas de Venn mostram o número de genes regulados para positivamente e negativamente ($P_{adj} < 0,01$; $\log \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1) (A) TS^{SYN} *mock*/ TS^{CYT} *mock* (vermelho) e TS^{SYN} infectado/ TS^{CYT} infectado (azul); (B) TS^{SYN} infectado/TS^{SYN} *mock* (rosa) e TS^{CYT} infectado/TS^{CYT} *mock* (amarelo); (C) Mapa de calor mostra genes que foram modulados em células TS^{SYN} e TS^{CYT} *mock* infectadas (M) e em células infectadas com *T. gondii* (I). ($P_{adj} < 0,01$; $\log \text{fold change} \geq 1$ ou ≤ -1). Um experimento em triplicata foi realizado.

Figura 8

A



B

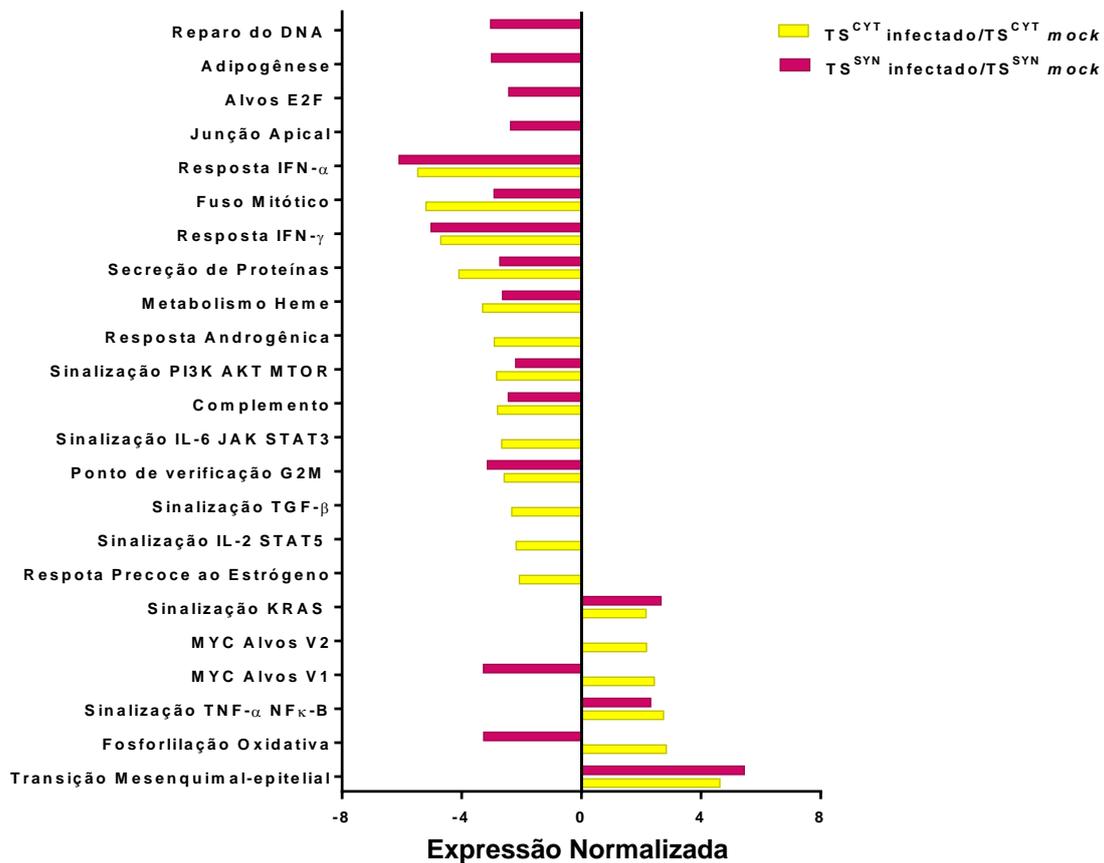


Figura 8: Análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA). Os gráficos mostram conjuntos de gene que foram enriquecidos negativamente ou positivamente utilizando o programa GSEA a partir de dados normalizados (rlog). Os conjuntos de genes modulados positivamente são mostrados nas barras à direita, e quando negativos, são identificados nas barras à esquerda. Os gráficos mostram *cluster* de genes modulados entre (A) TS^{SYN} *mock*/ TS^{CYT} *mock*, e entre células TS^{SYN} infectadas/ TS^{CYT} infectadas; (B) células TS^{CYT} infectadas/TS^{CYT} *mock* infectadas, e entre TS^{SYN} *mock*/TS^{CYT} *mock* infectadas (*FDR-q value* < 0,01). Foi realizado um experimento em triplicata.

Figura 9

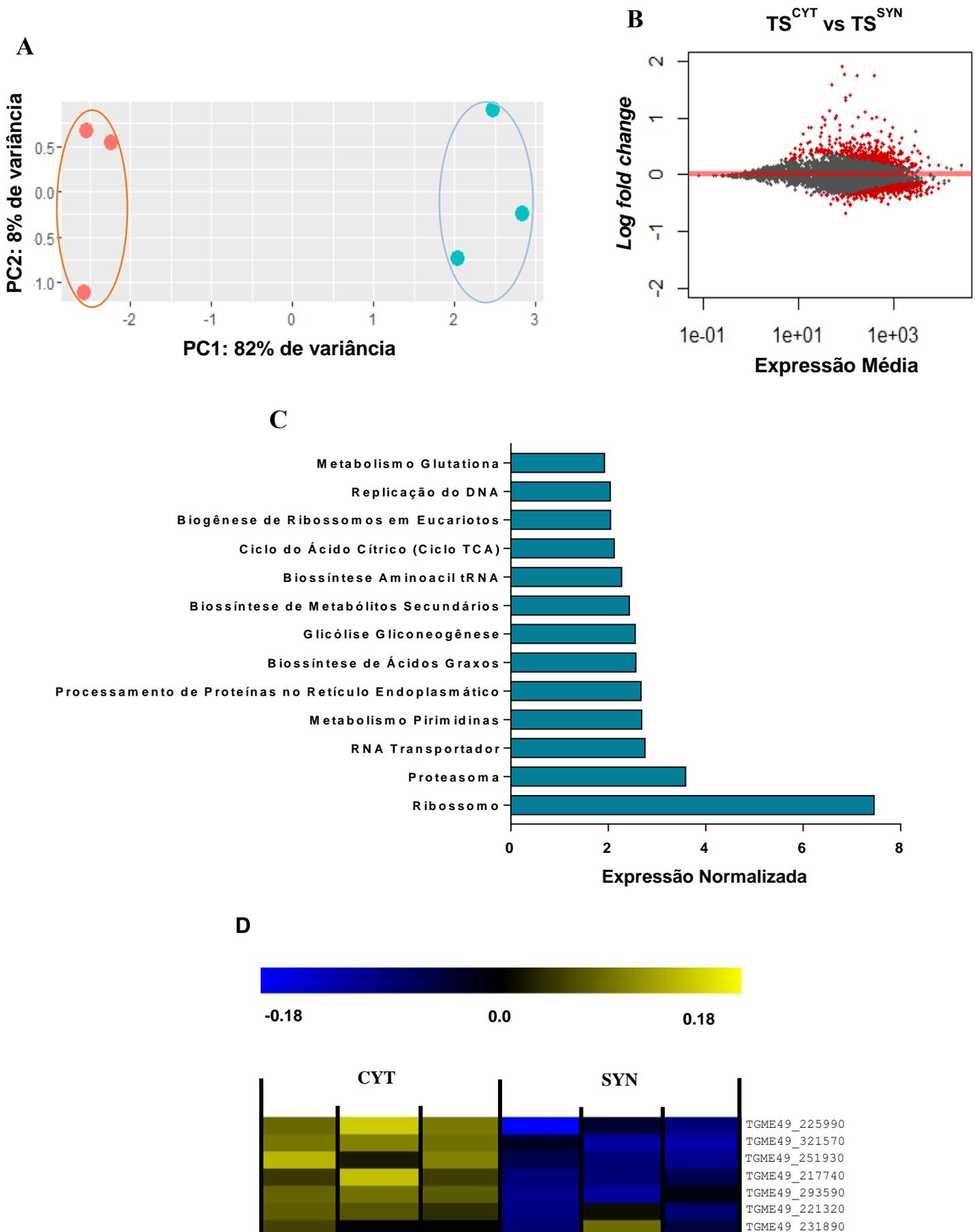


Figura 9. Análise da expressão gênica de parasitos associados ou que infectaram células TS^{CYT} e TS^{SYN}. Os genes de parasitos que infectaram células TS^{CYT} e TS^{SYN} foram mapeados com o genoma de *T. gondii* e analisados quanto à abundância de transcritos. **(A)** os componentes principais PC1 e PC2 mostram a diferença na expressão gênica de *T. gondii* quando associados às células TS^{CYT} (círculo laranja) e TS^{SYN} (círculo azul). **(B)** MA-plots de expressão de genes em parasitos associados às células TS^{CYT} e TS^{SYN}. Os pontos vermelhos representam genes de diferentes abundâncias expressos em parasitos que infectaram células TS^{CYT} em comparação com os que estavam associados às células TS^{SYN}. Os conjuntos de genes que foram enriquecidos positivamente foram analisados pelo programa GSEA a partir de dados normalizados (rlog) e pela lista de vias metabólicas KEGG para *T. gondii*. **(C)** os *clusters* de genes mostram vias que foram moduladas positivamente nos parasitos de TS^{CYT} em comparação com os parasitos provenientes da cultura de células TS^{SYN} (*FDR-q value* < 0,05). **(D)** Mapa de calor mostra transcritos de genes da via de biossíntese de ácidos graxos (*FDR-q value* < 0,05).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWER, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblast by *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis.**, v. 188, n. 4, p. 608-616, 2003. <https://doi.org/10.1086/377132>
- ABUMAREE, M. H.; STONE, P. R.; CHAMLE, L. W. The effects of apoptotic, deported human placental trophoblast on macrophages: possible consequences for pregnancy. **J Reprod Immunol.**, v. 72, n. 1-2, p. 33-45, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2006.03.001>
- ADACHI, O.; KAWAI, T.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, M.; TSUTSUI, H.; SAKAGAMI, M.; NAKANISHI, K.; AKIRA, S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 143-150, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80596-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80596-8)
- AL-MALKI, E. A. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. **Saudi J Biol Sci.**, v. 28, n. 1, p. 962-969, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.007>
- ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal- fetal interface. **Sci Immunol.**, v. 4, n. 31, p. 1-22. 2019. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>
- ANDER, S. E.; RUDZKI, E. N.; ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B.; BOYLE, J. P. Human placental syncytiotrophoblasts restrict *Toxoplasma gondii* attachment and replication and respond to infection by producing immunomodulatory chemokines. **mBio**, v. 9, n. 1, p. e01678-17, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.01678-17>
- ANDRADE, R. M.; WESSENDARP, M.; GUBBELS, J. M.; STRIEPEN, B.; SUBASTE, C. S. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 9, p. 2366-2377, 2006. <https://doi.org/10.1172/JCI28796>
- ARIAS, R. A.; MUNOZ, L. D.; MUNOZ-FERNANDES, M. A. Transmission of HIV-1 infection trophoblasts placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. **Virology**, v. 307, n. 2, p. 266-277, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00040-5)
- ARISUE, N.; HASHIMOTO, T. Phylogeny and evolution of apicomplexans and apicomplexan parasites. **Parasitol Int.**, v. 64, n. 3, p. 254-259, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005>

ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; DERMODY, T. S.; COYNE, C. B. Microbial vertical transmission during human pregnancy. **Cell Host Microbe**, v. 21, n. 5, p. 561-565, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>

ATTIAS, M.; TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; VOMMARO, R. C.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animation. **Parasit Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>

AZAR, C.; VALENTINE, M.; TRAUSSCH-AZAR, J.; DRULEY, T.; NELSON, D. M.; SCHWARTZ, A. L. RNA-Seq identifies genes whose proteins are transformative in the differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast, in human primary villous and BeWo trophoblasts. **Sci Rep.**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23379-2>

BARBOSA, B. F.; LOPES-MARIA, J. B.; GOMES, A. O.; ANGELONI, M. B.; CASTRO, A. S.; FRANCO, P. S.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; IETTA, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. IL-10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biol Reprod.**, v. 92, n. 3, p. 82-92, 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>

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

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-630, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.10.011>

BARGIERI, D.Y.; ANDENMATTEN, N.; LAGAL, V.; THIBERGE, S.; WHITELAW, J.A.; TARDIEUX, I.; MEISSNER, M.; MÉNARD, R. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. **Nat Commun.**, v. 4, p. 1-3, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3552>

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x>

BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. **Subcell Biochem.**, v. 47, p. 198-207, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_16

BAX, B. E.; BLOXAM, D. L. Energy metabolism and glycolysis in human placental trophoblast cells during differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1319, n. 2-3, p. 283-292, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00169-7)

BAYER, A.; LENNEMANN, N. J.; OUYANG, Y.; BRAMLEY, J. C.; MOROSKY, S.; MARQUES JR, E. T. A.; CHERRY, S.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705-712, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>

BENEDICTO, A.; ROMAYOR, I.; ARTETA, B. Role of liver ICAM-1 in metastasis. **Oncol Lett.**, v. 14, n. 4, p. 3833-3892, 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6700>

BIGNA, J. J.; TOCHIE, J. N.; TOUNOUGA, D. N.; BEKOLO, A. O.; YMELE, N. S.; YOUNDA, E. L.; SIME, P. S.; NANSSEU, J. R. Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review, modelling and meta-analysis. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x>

BLADER, I.; COLEMAN, B.; CHEN, C-T.; GUBBELS, M-J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annu Rev Microbiol.**, v. 69, p. 463-485, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BLUME, M.; SEEBER, F. Metabolic interaction between *Toxoplasma gondii* and its host. **F1000Res.**, v. 7, p. 1-10. 2018. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16021.1>

BODIGA, V. L.; INAPURAPU, S. P.; VEMURI, P. K.; KUDLE, M. R.; BODIGA, S. Intracellular zinc status influences cisplatin-induced endothelial permeability through modulation of PKC α , NF- κ B and ICAM-1 expression, **Eur J Pharmacol.**, v. 791, p. 355-368, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.013>

BOUGDOUR, A.; DURANDAU, E.; BRENIER-PINCHART, M-P.; ORTET, P.; BARAKAT, M.; KIEFFER, S.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R-L.;

BASTIEN, O.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; HAKIMI, M-A. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 4, p. 489-500, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002>

BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M-P.; HAMMOUDI, P-M.; CANNELLA, D.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; VOLLAIRE, J.; JOSSERAND, V.; TOUQUET, B.; COUTÉ, Y.; TARDIEUX, I.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M-A. The *Toxoplasma* effector TEEGR promotes parasite persistence by modulating NF- κ B signalling via EZH2. **Nat Microbiol.**, v. 4, n. 7, p. 1208-1220, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0431-8>

BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M-P.; YOGAVEL, M.; CURT-VARESANO, CURT-BERTINI, R-L.; HUSSAIN, T.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; TARDIEUX, I.; SHARMA, A.; BELRHALI, H.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M-A. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. **J Exp Med.**, v. 210, n. 10, p. 2071-2086, 2013. <https://doi.org/10.1084/jem.20130103>

BUI, T. M.; WIESOLEK, H. L.; SUMAGIN, R. ICAM-1: a master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. **J. Leu Bio.**, v. 108, n. 3, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>

BUXTON, D.; MARLEY, W. S.; ERIGHT, S. E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Vet Parasitol.**, v. 149, n. 1-2, p. 25-28, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.003>

CANTLE, S. J.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M.; SCHWEIKHART, G. Interpretation of syncytial sprouts and bridges in the human placenta. **Placenta**, v. 8, n. 3, p. 221-234, 1987. [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(87\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0143-4004(87)90046-4)

CARRUTHERS, V. B.; HAKANSSON, S.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infect Immun.**, v. 68, n. 7, p. 4005-4011, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4005-4011.2000>

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

CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J. S.; MADI, K.; FEIJÓ, D. F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; SOUZA, H. S. P.; BOZZA, M. T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-

induced pathology following oral infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025259>

CÉRÈDE, O.; DUBREMETZ, J. F.; SOÛTE, M.; DESLÉE, D.; VIAL, H.; BOUT, D.; LEBRUN, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **J Exp Med.**, v. 201, n. 3, p. 453-463, 2005. <https://doi.org/10.1084/jem.20041672>

CHAN, G.; STINSKI, M. F.; GUILBERT, L. J. Human cytomegalovirus-induced up-regulation of intercellular cell adhesion molecule-1 on villous syncytiotrophoblasts. **Biol Reprod.**, v. 71, n. 3, p. 797-803, 2004. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028118>

CHEN, J-L.; GE, Y-Y.; ZHANG, J.; QIU, X-Y.; QIU, J-F.; WU, J-P.; WANG, Y. The dysfunction of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to the abortion of mice caused by *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in early pregnancy. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069012>

CHEN, X.; KIM, T. D.; CARMAN, C. V.; MI, L-Z.; SONG, G.; SPRINGER, T. A. Structural plasticity in Ig superfamily domain 4 of ICAM-1 mediates cell surface dimerization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 39, p.15358-15363, 2007.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0707406104>

CHENG, S-C.; HUANG, W-C.; PANG, J-H.; WU, Y-H.; CHENG, C-Y. Quercetin inhibits the production of IL-1 β -induced inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NF- κ B signaling pathways. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 12, p. 1-24, 2019.
<https://doi.org/10.3390/ijms20122957>

CHOI, C. P.; MOON, A. S.; BACK, P. S.; JAMI-ALAHMADI, Y.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J. A photoactivatable crosslinking system reveals protein interactions in the *Toxoplasma gondii* inner membrane complex. **PLoS Bio.**, v. 17, n. 10, p. e3000475, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000475>

CROKEN, M. M.; QIU, W.; WHITE, M. W.; KIM, K. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of *Toxoplasma gondii* expression datasets links cell cycle progression and the bradyzoite development program. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-515>

DA SILVA, M. G.; VINAUD, M. C.; DE CASTRO, A. M. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women 452 and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **PLoS One**, v.10. n. 11, p. e0141700, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141700>

DE PAULA, R. R.; MARINHO, F. V.; FAHEL, J. S.; OLIVEIRA, S. C. Contribution of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) to control *Mycobacterium avium* infection. **Microbes Infect.**, v. 19, n. 11, p. 527-535, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.09.005>

DELORME-AXFORD, E.; DONKER, R. B.; MOUILLET, J-F.; CHU, T.; BAYER, A.; OUYANG, Y.; WANG, T.; STOLZ, D. B.; SARKAR, S. N.; MORELLI, A. E.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 29, p. 12048-12053, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110>

DEWI, B. E.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. **J Virol Methods**, v. 121, n. 171-180, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.013>

DIAMOND, M. S.; STAUNTON, D. E.; MARLIN, S. D.; SPRINGER, T. A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 961-971, 1991. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90548-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90548-D)

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* the first 100 years. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradizoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUBOIS, D. J.; SOLDATI-FAVRE, D. Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. **Cell Microbiol.**, v. 21, n. 5, p. e13018, 2019. <https://doi.org/10.1111/cmi.13018>

DUMETRE, A.; AUBERT, D.; PUECH, P. H.; HOHWEYER, J.; AZAS, N.; VILLENA, I. Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. **Appl Environ Microbiol.**, v. 78, n. 4, p. 905-912, 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.06488-11>

DUMETRE, A.; DUBEY, J. P.; FERGUSON, D. J.; BONGRAND, P.; AZAS, N.; PUECH, P. H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 28, p. 11535-11540, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308425110>

EGAL, E. S. A.; MARIANO, F. V.; BLOTTA, M. H.; PINÃ, A. R.; MONTALLI, V. A.; ALMEIDA, O. P.; ALTEMANI, A. M. ICAM-1 expression on immune cells in chronic villitis. **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1021-1026, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.004>

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

EWALD, S. E.; CHAVARRIA-SMITH, J.; BOOTHROYD, J. C. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, v. 82, n. 1, p. 460-468, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01170-13>

FATOOHI, A. F.; COZON, G. J.; GREENLAND, T.; FERRANDIZ, J.; BIENVENU, J.; PICOT, S.; PEYRON, F. Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 704-707, 2002. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.704-707.2002>

FERCHAUD- ROUCHER, V.; RUDOLPH, M. C.; JANSSON, T.; POWELL, T. L. Fatty acid lipid profile in primary human trophoblast over 90h in culture. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 121, p. 14-20, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.06.001>

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W. M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitol Res.**, v. 73, n. 6, p. 483-491, 1987. <https://doi.org/10.1007/BF00535321>

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

FISHER, S.; GENBACEV, O.; MAIDJI, E.; PEREIRA, L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblast in vitro and in utero: implications, of transmission and pathogenesis. **J Virol.**, v. 74, n. 15, p. 6808-6820, 2000. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6808-6820.2000>

FLECKENSTEIN, M. C.; REESE, M. L.; KONEN-WAISMAN, S.; BOOTHROYD, J. C.; HOWARD, J. D.; STEINFELDT, T. A *Toxoplasma gondii* pseudokinase inhibits host IRG resistance proteins. **PLoS Bio.**, v. 10, n. 7, p. e1001358, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001358>

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

FOROUTAN-RAD, M.; MAJIDIANI, H.; DALVAND, AHMADPOUR, E. Toxoplasmosis in blood donors: a systematic review and meta-analysis. **Transfus Med Rev.**, v. 30, n. 3, p. 116-122, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2016.03.002>

FOX, B. A.; FALLA, A.; ROMMEREIM, L. M.; TOMITA, T.; GIGLEY, J. P.; MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; WEISS, L. M.; BZIK, D. J. Type II *Toxoplasma gondii* KU80 knockout strains enable functional analysis of genes required for cyst development and latent infection. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. p. 1193–1206, 2011. <https://doi.org/10.1128/EC.00297-10>

FOX, B. A.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 3, p. 323-331, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.001>

FOX, B. A.; ROMMEREIM, L. M.; GUEVARA, R. B.; FALLA, A.; TRIANA, M. A. H.; SUN, Y.; BZIK, D. J. The *Toxoplasma gondii* rhoptry kinome is essential for chronic infection. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1-12, 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00193-16>

FRANCO, M., SHASTRI, A. J.; BOOTHROYD, J. C. Infection by *Toxoplasma gondii* specifically induces host c-Myc and the genes this pivotal transcription factor regulates. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 4, p. 483-493, 2014. <https://doi.org/10.1128/EC.00316-13>

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

FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to

prevent vertical transmission. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 181, p. 1-13, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.012>

FREIER, C. P.; KUHN, C.; RAPP, M.; ENDRES, S.; MAYR, D.; FRIESE, K.; ANZ, D.; JESCHKE, U. Expression of CCL22 and infiltration by regulatory T cells are increased in the decidua of human miscarriage placentas. **Am J Reprod Immunol.**, v.74, n. 3, p. 216-227, 2015. <https://doi.org/10.1111/aji.12399>

FRICK, C.; ODERMATT, A.; ZEN, K.; MANDELL, K. J.; EDENS, H.; PORTMANN, R.; MAZZUCHELLI, L.; JAYE, D. L.; PARKOS, C. A. Interaction of ICAM-1 with beta 2-integrin CD11c/CD18: characterization of a peptide ligand that mimics a putative binding site on domain D4 of ICAM-1. **Eur J Immunol.**, v. 35, n. 12, p. 3610-3621, 2005.
<https://doi.org/10.1002/eji.200425914>

FUJIGAKI, S.; SAITO, K.; TAKEMURA, M.; MAEKAWA, N.; YAMADA, Y.; WADA, H.; SEISHIMA, M. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. **Infect Immunol.**, v. 70, n. 2, p. 779-786, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.779-786.2002>

FUNG, C.; BECK, J. R.; ROBERTSON, S. D.; GUBBELS, M. J.; BRADLEY, P. J. *Toxoplasma* ISP4 is a central IMC sub-compartment protein whose localization depends on palmitoylation but not myristoylation. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 184, n. 2, p. 99-108, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.002>

FURTADO, J. M.; BHARADWAJ, A. S.; ASHANDER, L. M.; OLIVAS, A.; SMITH, J. R. Migration of *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells across human retinal vascular endothelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 53, n. 11, p. 6856-6862, 2012.
<https://doi.org/10.1167/iovs.12-10384>

GAFFURI, B.; VIGANO, P.; NOZZA, A.; GORNATI, G.; DI BLASIO, A. M.; VIGNALI, M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 messenger ribonucleic acid and protein in human term placental cells and its modulation by pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha). **Bio Reprod.**, v. 58, n. 4, p. 1003-1008, 1998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.4.1003>

GALAL, L.; HAMIDOVIĆ, A.; DARDÉ, M. L.; MERCIER, M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. **Food Waterborne Parasitol.**, v. 15, p. e00052, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00052>

GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J. R.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Congenital

toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **J Clin Microbiol.**, v. 35, n. 5, p. 1276-1277, 1997. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.5.1276-1277.1997>

GAY, G.; BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M. P.; VOLLAIRE, J.; JOSSERAND, V.; BERTINI, R. L.; VARESANO, A.; TOUQUET, B.; DE BOCK, P. J.; COUTE, Y.; TARDIEUX, I.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M. A. *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses. **J Exp Med.**, v. 213, n. 9, p. 1779-1798, 2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20160340>

GAZZINELLI R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 153, n. 6, p. 2533-2543, 1994.

GE, Y. Y.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; WU, J. P.; TAN, M. J.; HU, W.; LIANG, Y. J.; WANG, Y. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺ -regulatory T cells. **Parasite Immunol.**, v. 30, n. 9, p. 471-481, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01044.x>

GERBAUD, P.; PIDOUX, G. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. **Placenta**, v. 36, p. S35-S42, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.015>

GILBERT, L. A.; RAVINDRAN, S.; TURETZKY, J. M.; BOOTHROYD, J. C.; BRADLEY, P. J. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 73-83, 2007. <https://doi.org/10.1128/EC.00309-06>

GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; RIBEIRO, M.; SILVA, R. J.; GOIS, P. S. G.; ALMEIDA, K. C.; ANGELONI, M. B.; CASTRO, A. S.; GUIRELLI, P. M. CÂNDIDO, J. V.; CHICA, J. E. L.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents maternal death, but contributes to poor fetal outcome during congenital toxoplasmosis. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 1-18, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00906>

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

GORFU, G.; CIRELLI, K. M.; MELO, M. B.; MAYER-BARBER, K.; CROWN, D.; KOLLER, B. H.; MASTERS, S.; SHER, A.; LEPPLA, S. H.; MOAYERI, M.; SAEIJ, J. P. J.; GRIGGA, M. E. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **J American Soc Microb.**, v, 5, n. 1, p. 1-12, 2014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01117-13>

GRAS, S.; JACKSON, A.; WOODS, S.; PALL, G.; WHITELAW, J.; LEUNG, J. M.; WARD, G. E.; ROBERTS, C. W.; MEISSNER, M. Parasites lacking the micronemal protein MIC2 are deficient in surface attachment and host cell egress, but remain virulent *in vivo*. **Wellcome Open Res.**, v. 2, p. 1-26, 2017. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.11594.2>

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

HARDING, C. R.; MEISSNER, M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*. **Cell Microbiol.**, v. 16, n. 5, p. 632-641, 2014. <https://doi.org/10.1111/cmi.12285>

HARKER, K. S.; JIVAN, E.; MCWORTER, F. Y.; LIU, W. F.; LODOEN, M. B. Shear forces enhance *Toxoplasma gondii* tachyzoite motility on vascular endothelium. **MBio**, v. 5, p. e01111-e01113, 2014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01111-13>

HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunol.**, v. 37, p. 141-149, 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12163>

HE, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; BRAUN, L.; KRAUT, A.; TOUQUET, B.; COUTÉ, Y.; TARDIEUX, I.; HAKIMI, M. A.; BOUGDOUR, A. Characterization of a *Toxoplasma* effector uncovers an alternative GSK3/β-catenin-regulatory pathway of inflammation. **Elife**, v.7, p. 1-28, 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.39887>

HE, P.; SRIKRISHNA, G.; FREEZE, H. H. N-glycosylation deficiency reduces ICAM-1 induction and impairs inflammatory response. **Glycobiology**, v. 24, n. 4, p. 392-398, 2014. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu006>

HOLTAN, S. G.; CHEN, Y.; KAIMAL, R.; CREEDON, D. J.; ENNINGA, E. A. L.; NEVALA, W. K.; MARKOVIC, S. N. Growth modeling of the maternal cytokine milieu throughout normal pregnancy: macrophage-derived chemokine decreases as inflammation/counterregulation increases. **J Immunol Res.**, v, 2015, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/952571>

HOO, R.; NAKIMULI, A.; VENTO-TORMO, R. Innate immune mechanisms to protect against infection at the human decidual-placental interface. **Front Immunol.**, v. 11, p. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02070>

HOU, B.; BENSON, A.; KUZMICH, L.; DE FRANCO, A. L.; YAROVINSKY, F. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011549108>

HUANG, W-C.; WU, L-Y.; HU, S.; WU, S-J. Spilanthol inhibits COX-2 and ICAM-1 expression via suppression of NF- κ B and MAPK signaling in interleukin-1 β -stimulated human lung epithelial cells, **Inflammation**, v. 41, n. 5, p. 1934-1944, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0837-0>

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effector. **Nat Rev Microbiol.**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>

IGIETSEME, J. U.; ANANABA, G. A.; BOLIER, J.; BOWERS, S.; MOORE, T.; BELAY, T.; LYN, D.; BLACK, C. M.; The intercellular adhesion molecule type-1 is required for rapid activation of T helper type 1 lymphocytes that control early acute phase of genital chlamydial infection mice. **Immunology**, v. 98, n. 4, p. 510-518, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00926.x>

ISHIDA, W.; HARADA, Y.; FUKUDA, K.; FUKUSHIMA, A. Inhibition by the antimicrobial peptide LL37 of lipopolysaccharide-induced innate immune responses in human corneal fibroblasts. **Invest Ophthalmol. Vis Sci.**, v. 57, n. 1, p. 30-39, 2016.

JACQUET, A.; COULON, L.; DE NÈVE, J.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; BOLLEN, A.; JURADO, M.; BIEMANS, R. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 116, n. 1, p. 35-44, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00297-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00297-3)

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

JELENKA, J.; CRAWFORD, M. J.; HARB, O. S.; ZUTHER, E.; HASELKORN, R.; ROOS, D. S.; GORNICKI, P. Subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 5, p. 2723-2728, 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.051629998>

JELENSKA, J.; SIRIKHACHORNKIT, A.; HASELKORN, R.; GORNICKI, P. The carboxyltransferase activity of the apicoplast acetyl-CoA carboxylase of *Toxoplasma gondii* is the target of aryloxyphenoxypropionate inhibitors. **J. Biol Chem.**, v. 277, n. 26, p. 23208-23215, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200455200>

JIMENEZ-RUIZ, E.; MORLON-GUYOT, J.; DAHER, W.; MEISSNER, M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 209, n. 1-2, p. 18-25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.007>

JOKIMAA, V.; INKI, P.; KUJARI, H.; HIRVONEN, O.; EKHOLM, E.; ANTTILA, L.; Expression of syndecan-1 in human placenta and decidua. **Placenta**, v. 19, n. 2-3, p. 157-163, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(98\)90004-2](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(98)90004-2)

JONES, E. J.; KORCSMAROS, T.; CARDING, S. R. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 1, p. e1273865, 2017. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1273865>

JONES, J. L.; PARISE, M. E.; FIORE, A. E. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. **Am J Med Hyg.**, v. 90, n. 5, p. 794-799, 2014. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0722>

JULIANO, P. B.; BLOTTA, M. H. S. L.; ALTEMANI, A. M. A. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 750-757, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.07.008>

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun.**, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.617-621.2005>

KEMP, L. E.; YAMAMOTO, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 37, n. 4, p. 607-631, 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12013>

KLIMAN, H. J.; NESTLER, J. E.; SERMASI, E.; SANGER, J. M.; STRAUSS, J. F. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. **Endocrinology**, v. 118, p. 4, p. 1567-1582, 1986. <https://doi.org/10.1210/endo-118-4-1567>

KOBLANSKY, A. A.; JANKOVIC, D.; OH, H.; HIENY, S.; SUNGNAK, W.; MATHUR, R.; HAYDEN, M. S.; AKIRA, S.; SHER, A.; GHOSH, S. Recognition of profiling by Toll-

like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 119-130, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.016>

KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **J Fr Ophtamol.**, v. 33, n. 5, p. 362-367, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2010.03.002>

KOLAHI, K. S.; LOUEY, S.; VARLAMOV, O.; THORNBURG, K. Real-time tracking of BODIPY-C12 long-chain fatty acid in human term placenta reveals unique lipid dynamics in cytotrophoblast cells. **PLoS One**, v. 11, v.4, p. e0153522, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153522>

KOLAHI, K. S., VALENT, A. M.; THORNBURG, K. L. Cytotrophoblast, not syncytiotrophoblast, dominates glycolysis and oxidative phosphorylation in human term placenta. **Sci Rep.**, v. 7, p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42941>

KONG, D-H.; KIM, Y. K.; KIM, M. R.; JANG, J. H.; LEE, S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 19, n. 4, p. 1-16, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>

KUL, O.; YILDIZ, K.; OCAL, N.; FREYRE, A.; DENIZ, A.; KARAHAN, S.; ATMACA, H. T.; GOKPINAR, S.; DINCEL, G. C.; UZUNALIOGLU, T.; TERZI, O. S. In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. **Res Vet Sci.**, v. 94, n. 2, p. 269-276, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.08.001>

KULKARNI, M.; BOWMAN, E.; GABRIEL, J.; AMBURGY, T.; MAYNE, E.; ZILDAR, D. A.; MAIERHOFER, C.; TURNER, A. N.; BAZAN, J. A.; KOLETAR, S. L.; LEDERMAN, M. M.; SIEG, S. F.; FUNDERGURG, N. T. Altered monocyte and endothelial cell adhesion molecule expression is linked to vascular inflammation in human immunodeficiency virus infection. **Open Forum Infect Dis.**, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2016. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw224>

LABARRERE, C. A.; BAMMERLIN, E.; HARDIN, J. W.; DICARLO, H. L.; Intercellular adhesion molecule-1 expression in massive chronic intervillousites: implications for the invasion of maternal cells into fetal tissues. **Placenta**, v. 35, n. 5, p. 311-317, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.006>

LABARRERE, C. A.; ORTIZ, M. A.; SOSA, M. J.; CAMPANA, G. L.; WERNICKE, M.; BALDRIDGE, L. A.; TERRY, C.; DICARLO, H. L. Syncytiotrophoblast intercellular adhesion molecule-1 expression in placental villitis of unknown cause. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 193, n. 2, p. 483-488, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.12.090>

LACHENMAIER, S. M.; DELI, M. A.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **J Neuroimmunol.**, v. 232, n. 1-2, p. 119-130, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.029>

LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cell Microbiol.**, v. 8, n. 10, p. 1611-1623, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>

LAMBERT, H; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cell Microbiol.**, v. 12, n. 3, p. 292-300, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x>

LEE, S. J.; BENVENISTE, E. N. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. **J neuroimmunol.**, v. 98, n. 2, p.77-88, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00084-3)

LI, L.; SCHUST, D. J. Isolation, purification and in vitro differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta. **Reprod Biol Endocrinol.**, v. 13, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0070-8>

LI, X-L.; WEI, H-X.; ZHANG, H.; PENG, H-J.; LINDSAY, D. S. A meta-analysis on risk of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97775, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097775>

LIM, S. S-Y.; OTHMAN, R. Y.; Recent advances in *Toxoplasma gondii* immunotherapeutics. **Korean J Parasitol.**, v. 52, n. 6, p. 581-593, 2014. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.6.581>

LIMA, T. S.; LODOEN, M. B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 9, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00103>

LÓPEZ-YGLESÍAS, A. H.; CAMANZO, E.; MARTIN, A.T.; ARAUJO, A. M.; YAROVINSKY, F. TLR11-independent inflammasome activation is critical for CD4+ T cell-derived IFN- γ production and host resistance to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.**, v. 15, n. 6, p. e1007872, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007872>

LOWE, D. E.; ROBBINS, J. R.; BAKARDJIEV, A. I. Animal and human tissue models of vertical *Listeria monocytogenes* transmission and implications for other pregnancy-associated infections. **Infect Immun.**, v. 86, n. 6, p. e00801-17, 2018. <https://doi.org/10.1128/IAI.00801-17>

LÜDER, C. G. K.; RAHMAN, T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. **Microb Cell.**, v. 4, n. 7, p. 203-211, 2017. <https://doi.org/10.15698/mic2017.07.579>

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3352-3357, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00331-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00331-1)

MA, Y.; KRIKUN, G.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G.; GULLER, S. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. **Placenta**, v. 28, n. 10, p.1024-1031, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.05.003>

MALDONADO-ESTRADA, J.; MENU, E.; ROQUES, P.; BARRÉ-SINOUSI, F.; CHAOUAT, G. Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to access the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 286, n. 1-2, p. 21-34, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.03.001>

MALTEPE, E.; FISHER, S. J.; Placenta: the forgotten organ. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 31, p. 523-552, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125620>

MARQUES, C. S.; SOUSA, S.; CASTRO, A.; DA COSTA, J. M. C. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh vegetables and berry fruits. **Parasit Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04040-2>

MARTINS-DUARTE, E. S.; DUBAR, F.; LAWTON, P.; SILVA, C. F.; SOEIRO, M. N.; SOUZA, W.; BIOT, C.; VOMMARO, R. C. Ciprofloxacin derivatives affect parasite cell division and increase the survival of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125705, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125705>

MARTORELLI DI GENOVA, B.; WILSON, S. K.; DUBEY, J. P. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. **PLoS Biol.**, v. 17, n. 8, p. e3000364, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364>

MAUBERT, B.; GUILBERT, L. J.; DELORON, P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta. **Infect Immun.**, v. 65, n. 4, p. 1251-1257, 1997. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.4.1251-1257.1997>

MAZUMDAR, J.; WILSON, E. H.; MASEK, M.; HUNTER, C. A.; STRIEPEN, B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 35, p. 13192-13197, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603391103>

MCCONKEY, C. A.; DELORME-AXFORD, E.; NICKERSON, C. A.; KIM, K. S.; SADOVSKY, Y.; BOYLE, J. P.; COYNE, C. B. A three-dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. **Sci Adv.**, v. 2, n. 3, p. e1501462, 2016. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501462>

MELO, M. B.; JENSEN, K. D. C.; SAEJI, J. P. J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001>

MICHAILOWSKY, V.; CELES, M. R. N.; MARINO, A. P.; SILVA, A. A.; VIEIRA, L. Q.; ROSSI, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, v. 173, n. 1, p. 463-470, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.463>

MILLER, J.; KNORR, R.; FERRONE, M.; HOUDEI, R.; CARRON, C. P.; DUSTIN, M. L. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. **J Exp Med.**, v. 182, n. 5, p. 1231-1241, 1995. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1231>

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273. <https://doi.org/10.7476/9788570785237>

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

MOSLEY, M.; TORRES, J. B.; ALLEN, D.; CORNELISSEN, B. Immuno-imaging of ICAM-1 in tumours by SPECT. **Nucl Med Biol.**, v. 84, p.73-79, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.02.014>

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESA, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev.**, v. 240, n. 1, p. 269-285, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>

NAGINENI, C. N.; DETRICK, B.; HOOKS, J. J. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 68, n. 1, p. 407-410, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.407-410.2000>

NOLAN, S. J.; ROMANO, J. D.; COPPENS, I. Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 6, p. e1006362, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006362>

OCKLEFORD, C. D.; WAKELY, J.; BADLEY, R. A. Morphogenesis of human placental chorionic villi: cytoskeletal, syncytioskeletal and extracellular matrix proteins. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 212, n. 1188, p. 305-316, 1981. <https://doi.org/10.1098/rspb.1981.0041>

OHKURA, N.; KITAGAWA, Y.; SAKAGUCHI, S. Development and maintenance of regulatory T cells. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 414-423, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.002>

OKAE, H.; TOH, H.; SATO, T.; HIURA, H.; TAKAHASHI, S.; SHIRANE, K.; KABAYAMA, Y.; SUYAMA, M.; SASAKI, H.; ANIMA, T. Derivation of human trophoblast stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 1, p. 50-63, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.004>

OLGUÍN, J. E.; FERNÁNDEZ, J.; SALINAS, N.; JUÁREZ, I.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; CAMPUZANO, J.; CASTELLANOS, C.; SAAVEDRA, R. Adoptive transfer of CD4⁽⁺⁾ Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells to C57BL/6/J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated Th1 immune response. **Microbes Infect.**, v. 17, n. 8, p. 586-595, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.04.002>

OPITZ, C.; SOLDATI, D. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 597-604, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x>

PALANISAMY, M.; MADHAVAN, B.; BALASUNDARAM, M. B.; ANDAVAR, R.; VENKATAPATHY, N. Outbreak of ocular toxoplasmosis in Coimbatore, India. **Indian J Ophthalmol.**, v. 54, n. 2, p. 129-131, 2006. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.25839>

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol.**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

PASSOS, S. T.; SILVER, J. S.; O'HARA, A. C.; SEHY, D.; STUMHOFER, J. S.; HUNTER, C. A. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. **J Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1776-1783, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901843>

PERIZ, J.; DEL ROSARIO, M.; MCSTEAN, A.; GRAS, S.; LONEY, C.; WANG, L.; MARTIN-FERNANDEZ, M. L.; MEISSNER, M. A highly dynamic F-actin network

regulates transport and recycling of micronemas in *Toxoplasma gondii* vacuoles. **Nat Commun.**, v. 10, n. 1, p.1-16, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12136-2>

PERNAS, L.; BEAN, C.; BOOTHROYD, J. C.; SCORRANO, L. Mitochondria restrict growth of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by limiting its uptake of fatty acids. **Cell Metab.**, v. 27, n. 4, p. 886-897, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.018>

PEYRON, F.; L'OLLIVIER, C.; MANDELBROT, L.; WALLON, M.; PIARROUX, R.; KIEFFER, F.; HADJADJ, E.; PARIS, L.; GARCIA-MERIC, P. maternal and congenital toxoplasmosis: diagnosis and treatment recommendations of a French multidisciplinary working group. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010024>

PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; KLEIN, J. P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. **Immunol Cell Biol.**, v. 83, n. 5, p. 483-489, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01356.x>

PINTO-FERREIRA, F.; CALDART, E. T.; PASQUALI, A. K.; S.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. **Emerg Infect Dis.**, v. 25, n. 12, p. 2177-2182, 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181565>

PLATTNER, F.; YAROVINSKY, F.; ROMERO, S.; DIDRY, D.; CARLIER, M. F.; SHER, A.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 2, p. 77-87, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.01.001>

POBER, J. S.; GIMBRONE, M. A. JR.; LAPIERRE, L. A.; MENDRICK, D. L.; FIERS, W.; ROTHLEIN, R.; SPRINGER, T. A. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. **J Immunol.**, v.137, n. 6, p. 1893-1896, 1986.

RAMAKRISHNAN, S.; DOCAMPO, M. D.; MACRAE, J. I.; PUJOL, F. M.; BROOKS, C. F.; VAN DOOREN, G. G.; HILTUNEN, J. K.; KASTANIOTIS, A. J.; MCCONVILLE, M. J.; STRIEPEN, B. Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem.**, v. 287, n. 7, p. 4957-4971, 2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310144>

RAMOS, T. N.; BULLARD, D. C.; BARUM, S. R. ICAM-1: isoforms and phenotypes. **J Immunol.**, v. 192, n. 10, p. 4469-4474, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400135>

RASTOGI, S.; CYGAN, A. M.; BOOTHROYD, J. C.; Translocation of effector proteins into host cells by *Toxoplasma gondii*. **Curr Opin Microbiol.**, v. 52, p. 130-138, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.07.002>

RICO-TORRES, C. P.; VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; CORREA, D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 35, n. 7, p. 1079-1088, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2656-2>

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

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

ROBBINS, J. R.; SKRZYPCZYNSKA, K. M.; ZELDOVICH, V. B.; KAPIDZIC, M.; BAKARDJIEV, A. I. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 1, p. e1000732 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000732>

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **J Infect.**, v. 68, p. 125-133, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.023>

ROSOWSKI, E. E.; LINDSAY, D. L.; RODDA, L.; GAISER, R. A.; JENSEN, K. D. C.; SAEIJ, J. P. Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **J Exp Med.**, v. 208, n. 1, p. 195-212, 2011. <https://doi.org/10.1084/jem.20100717>

ROSTAMI, A.; RIAHI, S. M.; CONTOPOULOS-LOANNIDIS, D. G.; GAMBLE, H. R.; FAKHRI, Y.; SHIADEH, M. N.; FOROUTAN, M. BEHNIAFAR, H.; TAGHIPOUR, A.; MALDONADO, Y. A.; MOKDAD, A. H.; GRASSER, R. B. Acute *Toxoplasma* infection in pregnant women worldwide: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 13, n. 10, p. e0007807, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007807>

ROSTAMI, A.; RIAHI, S. M.; GAMBLE, H. R.; FAKHRI, Y.; NOUROLLAHPOUR SHIADEH, M.; DANESH, M.; BEHNIAFAR, H.; PAKTINAT, S.; FOROUTAN, M.; MOKDAD, A. H.; HOTEZ, P. J.; GASSER, R. B. Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect.**, v. 26, n. 6, p. 673-683, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.008>

ROTHLEIN, R.; DUSTIN, M. L.; MARLIN, S. D.; SPRINGER, T. A. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. **J. Immunol.**, v. 137, n. 4, p. 1270-1274, 1986.

SA, Q.; WOODWARD, J.; ZUZUKI, Y. IL-2 produced by CD8⁺ immune T cells can augment their IFN- γ production independently from their proliferation in the secondary response to intracellular pathogen. **J Immunol.**, v. 190, n. 5, p. 2199-2207, 2013.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202256>

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

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

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L. D.; BROOKE-POWELL, E. T.; AJIOKA, J. W.; BOOTHROYD, J. C. Polimorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1780-1783, 2006.

<https://doi.org/10.1126/science.1133690>

SAFRONOVA, A.; ARAUJO, A.; CAMANZO, E. T.; MOON, T. J.; ELLIOT, M. R.; BEITING, D. P.; YAROVINSKY, F. Alarmin S100A11 initiates a chemokine response to the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Nat Immunol.**, v. 20, n. 1, p. 64-72, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0250-8>

SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; ITO, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **Am J Reprod Immunol.**, v. 63, n. 6, p. 601-610, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol.**, v. 22, p. 531-562, 2004.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>

SALINAS, N.; OLGUÍN, J. E.; CASTELLANOS, C.; SAAVEDRA, R. T cell suppression *in vitro* during *Toxoplasma gondii* infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells. **Scand J Immunol.**, v. 79, n. 1, p. 1-11, 2014.

<https://doi.org/10.1111/sji.12120>

SANECKA, A.; FRICKEL, E. A. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 678-689, 2014.

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

SARELIUS, I. H.; GLADING, A. J. Control of vascular permeability by adhesion molecules. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1-2, p. e985954, 2015.

<https://doi.org/10.4161/21688370.2014.985954>

SHAPIRO, K.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; DIXON, B.; DUMÈTRE, A.; DE WIT, L. A.; VANWORMER, E.; VILLENA, I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: oocysts in water, soil and food. **Food Waterborne Parasitol.**, v. 15, p. e00049, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>

SHAPIRO, K.; LARGIER, J.; MAZET, J. A. K.; BERNT, W.; ELL, J. R.; MELLI, A. C.; CONRAD, P. A. Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. **Appl Environ Microbiol.**, v. 75, n. 4, p. 1185-1191, 2009. <https://doi.org/10.1128/AEM.02109-08>

SHIONO, Y.; MUN, H. S.; HE, N.; NAKAZAKI, Y.; FANG, H.; FURUYA, M.; AOSAI, F.; YANO, A. Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon-gamma deficient pregnant mice. **Parasitol Int.**, v. 56, n. 2, p. 141-148 2007. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.01.008>

SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.10.005>

SHWAB, E. K.; SARAF, P.; ZHU, X-Q.; ZHOU, D-H.; MCFERRIN, B. M.; AJZENBERG, D.; SCHARES, G.; HAMMOND-AYREE, K.; VAN HELDEN, P.; HIGGINS, S. A.; GERHOLD, R. W.; ROSENTHAL, B. M.; ZHAO, X.; DUBEY, J. P.; SU, C. 2018. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 29, p. e6956-e6963, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>

SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

SILVA, J. L.; REZENDE-OLIVEIRA, K.; DA SILVA, M. V.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; PEGHINI, B. C.; SILVA, N. M.; MINEO, J. R.; RODRIGUES JÚNIOR, V. IL -17 - expressing CD4+ and CD8+ T lymphocytes in human toxoplasmosis. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, p.1-7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/573825>

SLOVES, P. J.; MOUVEAUX, T.; AITA-YAHIA, S.; VORNG, H.; EVERAERE, L.; SANGARE, L. O.; TSICOPOULOS, A.; TOMAVO, S. Apical organelle secretion by *Toxoplasma gondii* controls innate and adaptive immunity and mediates long-term protection. **J Infect Dis.**, v. 212, n. 9, p. 1449-1458, 2015. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv250>

SMITH, N. C.; GOULART, C.; HAYWARD, J. A.; KUPZ, A.; MILLER, C. M.; VAN DOOREN, G. G. Control of human toxoplasmosis. **Int J Parasitol.**, v. 51, n. 2-3, p. 95-121, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>

SOKOL-BORRELLI, S. L.; COOMBS, R. S.; BOYLE, J. P. A comparison of stage conversion in the coccidian apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, e *Neospora caninum*. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 10, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608283>

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 31, v. 12, p. 1293-1302, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00257-0)

SOLDATI-FAVRE, D. Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 197-205, 2008. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153197>

SOMMERVILLE, C.; RICHARDSON, J. M.; WILLIAMS, R. A. M.; MOTTRAM, J. C.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J.; HENRIQUEZ, F. L. Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 18, p. 12733-12741, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.419911>

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

STAUNTON, D. E.; DUSTIN, M. L.; ERICKSON, H. P.; SPRINGER, T. A. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus, **Cell**, v. 61, n. 2, p. 243-254, 1990. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90805-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90805-O)

SUGI, T.; TU, V.; MA, Y.; TOMITA, T.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii* requires glycogen phosphorylase for balancing amylopectin storage and for efficient production of brain cysts. **MBio**, v. 8, n. 4, p. e01289-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/mBio.01289-17>

SUGIYAMA, T.; CUEVAS, L. E.; BAILEY, W.; MAKUNDE, R.; KAWAMURA, K.; KOBAYASHI, M.; MASUDA, H.; HOMMEL, M. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in *Plasmodium falciparum*-infected placenta. **Placenta**, v. 22, n. 6, p. 573-579, 2001. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0692>

TEIJEIRA, A.; HUNTER, M. C.; RUSSO, E.; PROULX, S. T.; FREI, T.; DEBES, G. F.; COLES, M.; MELERO, I.; DETMAR, M.; ROUZAUT, A.; HALIN, C. T cell migration from inflamed skin to draining lymph nodes requires intralymphatic crawling supported by ICAM-1/ LFA-1 interactions, **Cell reports**, v. 18, n. 4, p. 857-865, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.078>

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

TEWELDEMEDHIN, M.; GEBREMICHAEL, A.; GEBERKRSTOS, G.; HADUSH, H.; GEBREWAHID, T.; ASGEDOM, S. W.; GIDEY, B.; ASRES, N.; GEBREYESUS, H. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Adwa district, northern Ethiopia. **BMC Infect Dis.**, v. 19, n. 2019, p. 1-9, 2019.

<https://doi.org/10.1186/s12879-019-3936-0>

TOMITA, T.; SUGI, T.; YAKUBU, R.; TU, V.; MA, Y.; WEISS, L. M. Making home sweet and sturdy: *Toxoplasma gondii* ppGalNAc-Ts glycosylate in hierarchical order and confer cyst wall rigidity. **MBio**, v. 8, n.1, p. e02048- e0204816, 2017.

<https://doi.org/10.1128/mBio.02048-16>

TU, V.; MAYORAL, J.; SUGI, T.; TOMITA, T.; HAN, B.; MA, Y. F.; WEISS, L. M. Enrichment and proteomic characterization of the cyst wall from *in vitro* *Toxoplasma gondii* cysts. **MBio**, v. 10, n. 2, p. e00469-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/mBio.00469-19>

TURCO, M. Y.; MOFFETT, A. Development of the human placenta. **Development**, v. 146, n. 22, p.1-14, 2019. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>

VARET, H.; BRILLET-GUÉGUEN, L.; COPPÉE, J-Y.; DILLIES, M-A. SARTools: a DESeq2- and EdgeR-Based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157022, 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>

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

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

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

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

VERMA, S.; HIBY, S. E.; LOKE, Y. W.; KING, A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biol Reprod.**, v. 62, n. 4, p. 959-968, 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.959>

VILLARES, M.; BERTHELET, J.; WEITZMAN, J. B. The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression. **Semin Immunopathol.**, v.42, n. 2, p. 215-226, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00779-z>

WALDMAN, B. S.; SCHWARZ, D.; WADSWORTH, M. H.; SAEIJ, J. P.; SHALEK, A. K.; LOURIDO, S. Identification of a master regulator of differentiation in *Toxoplasma*. **Cell**, v. 180, n. 2, p. 359-372, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.013>

WALKER, M.; ZUNT, J. R. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts. **Clin Infect Dis.**, v. 40, n. 7, p. 1005-1015, 2005. <https://doi.org/10.1086/428621>

WALLER, R. F.; KEELING, P. J.; DONALD, R. G.; STRIEPEN, B.; HANDMAN, E.; LANG-UNNASCH, N.; COWMAN, A. F.; BESRA, G. S.; ROOS, D. S.; MCFADDEN, G. I. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 21, p. 12352-12357, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12352>

WALON, M.; PEYRON, F.; Congenital toxoplasmosis: a plea for a neglected disease. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010025>

WANG, W.; SUNG, N.; GILMAN-SACHS, A.; KWAK-KIM, J. T helper (Th) cell profile in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells. **Front Immunol.**, v. 11, p.1-14, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02025>

WEIGHT, C.M.; CARDING, S. R. The protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* targets the paracellular pathway to invade the intestinal epithelium. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1258, p. 135-142, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06534.x>
WEIGHT, C. M.; JONES, E. J.; HORN, N.; WELLNER, N.; CARDING, S. R. Elucidating pathways of *Toxoplasma gondii* invasion in the gastrointestinal tract: involvement of the tight junction protein occludin. **Microbes Infect.**, v. 17, n. 10, p. 698-709, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.07.001>

WICE, B.; MENTON, D.; GEUZE, H.; SCHWARTZ, A. L. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. **Exp Cell Res.**, v. 186, n. 2, p.306-316, 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(90\)90310-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(90)90310-7)

WINDISH, H. P.; LIN, P. L.; MATTILA, J. T.; GREEN, A. M.; ONUOBA, E. O.; KANE, L. P.; FLYNN, J. L. Aberrant TGF-beta signaling reduces T regulatory cells in ICAM-1-deficient mice, increasing the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Leukoc Biol.**, v. 86, n. 3, p. 713-725, 2009. <https://doi.org/10.1189/jlb.1208740>

XIAO, J.; GARCIA-LLORET, M.; WINKLER, B.; MILLER, R.; SIMPSON, K.; GUILBERT, L. J. ICAM-1 mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblasts: implication of placental villitis. **Am J Pathol.**, v. 150, n. 5, p. 1845-1860, 1997.

YAMAMOTO, M.; STANDLEY, D. M.; TAKASHIMA, S.; SAIGA, H.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; KUBO, E.; ITO, H.; TAKAURA, M.; MATSUDA, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of STAT3. **J Exp Med.**, v. 206, n. 12, 2747-2760, 2009. <https://doi.org/10.1084/jem.20091703>

YAN, C.; LIANG, L.; ZHENG, K.; ZHU, X. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasite & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1432-6>

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626-1629, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1109893>

YU, X.; SHANGA, H.; JIANG, Y. ICAM-1 in HIV infection and underlying mechanisms. **Cytokine**, v. 125, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154830>

ZELDOVICH, V. B.; CLAUSEN, C. H.; BRADFORD, E.; FLETCHER, D. A.; MALTEPE, E.; ROBBINS, J. R.; BAKARDJIEV, A. I. Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 12, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003821>

ZHANG, H.; CUI, L.; REN, L.; LIU, X.; JIANG, Y.; YANG, C.; HU, X.; LI, F. The role of decidual PD-1+ Treg cells in adverse pregnancy outcomes due to *Toxoplasma gondii* infection. **Inflammation**, v. 42, n. 6, p. 2119-2128, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01075-1>

ZHAO, W.; FENG, H.; GUO, S.; HAN, Y.; CHEN, X. Danshenol A inhibits TNF- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mediated by NOX4 in endothelial cells. **Sci Rep.**, v. 7, n. 1, p. e12953, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13072-1>

ZHOU, W.; QUAN, J.; LEE, Y.; SHIN, D.; CHA, G. *Toxoplasma gondii* proliferation require down-modulation of host Nox4 expression via activation of PI3/kinase/Akt signaling pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p.e66306, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066306>

ZHU, W.; LI, J.; PAPPOE, F.; SHEN, J.; YU, L. Strategies developed by *Toxoplasma gondii* to survive in the host. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00899>

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315

Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;

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

ANÁLISE FINAL Nº 011/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 142/16

Projeto Pesquisa: “Papel funcional da Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1) na transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*”.

Pesquisador Responsável: Bellisa de Freitas Barbosa

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 13 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU