

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

Vilos placentários humanos modulam a susceptibilidade de células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) à infecção por *Toxoplasma gondii*

ILIANA CLAUDIA BALGA MILIÁN

Uberlândia
Agosto, 2021

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

Vilos placentários humanos modulam a susceptibilidade de células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) à infecção por *Toxoplasma gondii*

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

Aluna: Iliana Claudia Balga Milián

Orientadora: Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia
Agosto, 2021

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

M644 2021	<p>Milian, Iliana Claudia Balga, 1991-</p> <p>Vilos placentários humanos modulam a susceptibilidade de células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> [recurso eletrônico] : vilos placentários humanos modulam a susceptibilidade de células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> / Iliana Claudia Balga Milian. - 2021.</p> <p>Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro. Coorientadora: Priscila Silva Franco. 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.2021.366 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira, 1964-, (Orient.). II. Franco, Priscila Silva, 1985-, (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:



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 nº 140				
Data:	vinte de agosto de dois mil e vinte um	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:20
Matrícula do Discente:	11713IPA001				
Nome do Discente:	Iliana Claudia Balga Milian				
Título do Trabalho:	Vilos placentários humanos modulam a susceptibilidade de células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos Causadores de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Participação funcional do fator de inibição da migração de macrófago (mif) e outras citocinas em trofoblasto humano infectado por <i>toxoplasma gondii</i> : estudo in vitro em linhagem de coriocarcinoma humano (bewo) e explantes de placentas				

Reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, dia 20/08/2021, assim composta pelos titulares: Professoras Doutoras: Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes, UFTM; Profa. Dra. Idessânia Nazareth da Costa, UEL; Profa. Dra. Letícia de Souza Castro Filice, FAMED/UFU; Profa. Dra. Juliana Gonzaga de Oliveira, ICBIM/UFU; Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, PPIPA/ UFU- (Presidente) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, apresentou a Comissão Examinadora e o a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da 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 **Eloisa Amália Vieira Ferro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/08/2021, às 18:24, 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 **Idessania Nazareth Costa, Usuário Externo**, em 20/08/2021, às 18:24, 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 **Leticia de Souza Castro Filice, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/08/2021, às 18:24, 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 **Juliana Gonzaga de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/08/2021, às 18:24, 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 20/08/2021, às 18:24, 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 **2924902** e o código CRC **ESF2FDA9**.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, Leslie Milián e Alberto Balga, que sempre foram minhas inspirações e meus super heróis na vida. Vocês sempre me ensinaram a ser persistente, ética, leal as minhas crenças e as minhas raízes e acima de tudo uma guerreira. Como temos vivenciado nos últimos anos, a vida é uma caixinha de surpresa, e com o atual momento que vivemos percebemos o quanto a vida é rápida e o quanto temos que aproveitar os bons momentos. Agradeço eternamente por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por me dar forças diariamente para que eu não desista dos meus sonhos.

Também, gostaria de dedicar este trabalho ao meu namorado Gabriel Almeida, que tem estado ao meu lado todos os dias através do seu companheirismo, amor e apoio e a minha família, querida e amada que sempre estão ao meu lado em todos os momentos me incentivando. E por último, dedico este trabalho ao meu amado Paquito, meu fiel amigo, que ao longo dos 16 anos esteve comigo em todas as minhas conquistas e infelizmente não estará presente para ver a concretização de mais uma.

Amo todos vocês!

Agradecimento especial

Gostaria de agradecer especialmente a minha orientadora Dra.

Eloisa A. V. Ferro por ter confiado este trabalho tão lindo em minhas mãos assim como ter me dado a oportunidade em poder trabalhar ao seu lado. Tenho muito orgulho em trabalhar com uma professora tão apaixonada por seu trabalho, assim como admiro sua capacidade de sempre colocar em primeiro lugar o amor e a dedicação à pesquisa acima de tudo e por me deixar fazer parte dessa grade família.

Encerro este ciclo sabendo de toda a bagagem profissional que adquiri ao longo deste tempo juntamente com você e tenho certeza que o meu crescimento pessoal e profissional foi graças à oportunidade de trabalhar no laboratório.

Também agradeço a minha coorientadora Dra. Priscila Franco, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, de ensinamento, conselho, ombro amigo e me acolhendo para dentro da sua família.

Apenas tenho gratidão por fazer parte da sua vida e por nunca ter desistido de mim.

Agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos e colegas que me ajudaram, apoiaram e estiveram todos os dias ao meu lado durante estes anos no laboratório como, Rafaela, Andressinha, Mayara, Angelica, Bellisa, Fernanda, Guilherme, Alessandra, Pamela, Luana, Thadia, Samuel, Mariana, Idessania, Juliana e Leticia. Vocês fizeram parte da minha história e deste ciclo. Aceitaram-me de braços aberto como colega e principalmente como amiga, ensinaram-me o valor da amizade. Dividimos muitos abraços, choros, puxões de orelhas, sorrisos e companheirismo, vocês são pessoas muito especiais! Só tenho agradecimentos a todos vocês, eu não teria conseguido sem o apoio dessa equipe.

Também gostaria de agradecer a professora Neide por ter ajudado neste trabalho e futuro projeto assim como seus alunos que sempre estenderam a mão para me ajudar como, Estér, Marcos Paulo, Yusmaris e a Marisol. Muito obrigada pelo ensinamento e, principalmente nos momentos que precisei de ajuda em experimentos, células e/ou parasitos.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro e a FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

h – Hora

min- minuto

β-actina - beta-actina

μg – microgramas

μL – microlitros

ATCC - American Type Culture Collection

APS - Células Apresentadoras de Antígenos

CBA - *Cytometric Beads Array*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CO₂ - Dióxido de carbono

CPRG - Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo

ELISA - *Enzyme -Linked Immunosobert Assay*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

HUVEC - Célula endotelial da veia umbilical

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

ICAM - Molécula de adesão intracelular

IFN-γ - Interferon gama

IL- Interleucina

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MIF - Fator de Inibição de Macrófagos

NaCl - Cloreto de sódio

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos

PVDF - *Polyvinylidene fluoride*

RIPA - Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SBF - Soro Fetal Bovino

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Toxoplasma gondii - *T. gondii*

TEER - Resistência Elétrica Transepitelial

TGF-Fator transformador de crescimento
TNF- Fator de necrose tumoral
IFN- Interferon
UFU - Universidade Federal de Uberlândia
HC- Hospital de Clínicas
WB - *Western blotting*
RH - Cepa RH
2F1- Taquizoítas 2F1
NK - *Natural Killer*
DCs - Células dendríticas
TEVi -Trofoblasto extraviloso intersticial
TEVe – Trofoblasto extraviloso endovascular
ECs - Células endoteliais
ECM - Matriz extracelular
EC - Endoteliais
TJ - *Tight Junction Protein*
ZO - Zônula ocludina
AMS - Molécula de ativação
VCAM - Molécula de adesão de células vasculares
Th1- Pró-inflamatório
Th2 - Anti-inflamatório
HCL - Ácido clorídrico
NaOH - Hidróxido de sódio
TMB - Tetrametilbenzidina
Na₃VO₄ - Ortovanadato de sódio
NaF - Fluoreto de sódio
MIC2 - micronema tipo 2
ROPS - roptrias
GRA – grânulos densos
PVDF - Poli (fluoreto de vinilideno)
MMP-2/9 - Metaloproteinase-2/9
H₂O₂ -Peróxido de hidrogênio
BUVEC - Célula da veia umbilical primária de bovinos

NAD (P) H-oxidase - Complexo enzimático

HMEC-1- Células endoteliais microvasculares humanas

PECAM-1 - Células endoteliais

T CD4⁺ - Linfócitos

BBB - Barreira hematoencefálica

HCMV - Citomegalovírus

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

HSV-1 - Vírus do Herpes simplex tipo I

Sumário

RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1.INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Gestação e placenta.....	15
1.2 Explantes placentários	16
1.3 Células trofoblásticas extravilosas e a linhagem HUVEC.....	18
1.4 <i>Toxoplasma gondii</i> : características gerais	22
1.5 Toxoplasmose	25
1.6 Toxoplasmose congênita.....	27
2.OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos geral.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3.MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Coleta de placentas e cultura dos vilos placentários.....	30
3.2 Cultura celular.....	31
3.3 Manutenção do clone 2F1 de <i>T. gondii</i>	31
3.4 Preparação do meio condicionado dos vilos placentários.....	32
3.5 Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> nas células HUVEC	32
3.6 Ensaio Imunoenzimático – ELISA	33

3.7 Permeabilidade celular nas células HUVEC	34
3.8 Resistência Elétrica nas células HUVEC.....	34
3.9 Imunofluorescência para detecção de ZO-1 em células HUVEC.....	35
3.10 <i>Western blotting</i>	36
3.11 Bloqueio de ICAM-1 por meio de anti-ICAM-1	37
3.12 Normas de biossegurança	37
3.13 Análise estatística	37
4.RESULTADOS	38
4.1 Meio condicionado aumenta a infecção de <i>T. gondii</i> nas células HUVEC	38
4.2 Células HUVEC infectadas produzem citocinas pró-inflamatórias.....	38
4.3 A infecção por <i>T. gondii</i> e o tratamento com meio condicionado alteraram a integridade da barreira nas células HUVEC.....	39
4.4 Infecção por <i>T. gondii</i> e o tratamento com meio condicionado são capazes de alterar a resistência elétrica transepitelial.....	40
4.5 As células HUVEC tratadas com os meios condicionados e infectadas por <i>T.gondii</i> diminuem a expressão de ZO-1	40
4.6 O meio condicionado infectado ativa a expressão da proteína ICAM-1 nas células HUVEC	41
4.7 Tratamento com anticorpo neutralizante de ICAM-1, diminui a proliferação de.....	41
<i>T. gondii</i> nas células HUVEC.....	41
5.DISSCUSSÃO	42
6.CONCLUSÕES	48

7.FIGURAS	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	97
ANEXO I.....	98
ANEXO II.....	99

RESUMO

Toxoplasma gondii tem a propriedade de invadir tecidos e atravessar barreiras biológicas em humanos infectados. O parasita alcança locais imune-privilegiados, como a placenta e infecta diferentes populações de células placentárias, bem como as células endoteliais. Neste estudo, investigamos a influência de meio de cultura (meio condicionado) provenientes de explantes de vilosidades coriônicas, infectadas ou não por *T. gondii*, sobre células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). As células HUVEC foram infectadas com taquizoítas da cepa RH (2F1) de *T. gondii* e tratadas com meio condicionado infectado ou não infectados por *T. gondii*. A proliferação intracelular do parasita foi analisada pelo ensaio colorimétrico de β -galactosidase e a dosagem de citocinas por ELISA. A permeabilidade e a resistência elétrica (TEER) também foram analisadas, utilizando ensaio de fluorescência em cultura em *transwell*. A expressão da proteína ZO-1 foi realizada pela imunofluorescência e a expressão de ICAM-1 por *Western blotting*. As células infectadas e tratadas com meio condicionado apresentaram alta carga parasitária, maior produção de citocina pró-inflamatória e maior permeabilidade em oposição à resistência elétrica transepitelial. O tratamento com meio condicionado infectado ou não, bem como a infecção das células HUVEC induziram menor expressão de ZO-1. A expressão de ICAM-1 foi alterada pelo meio condicionado, independente da infecção, em células HUVEC, infectadas ou não. A inibição da proteína de adesão ICAM-1, aumentou a proliferação parasitária nas células HUVEC. Tomados em conjunto, os dados demonstraram que a infecção por *T. gondii* e o tratamento com meio condicionado infectado alteram a secreção de citocinas e a resistência elétrica, aumentando a permeabilidade celular devido a uma alteração de ICAM-1 e diminuição da expressão de ZO-1 assim facilitando a proliferação parasitária nas células HUVEC.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, células HUVEC, expressão de ICAM-1, citocinas, permeabilidade celular, resistência elétrica e ZO-1.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii has the property of invading tissues and crossing biological barriers in infected humans. The parasite reaches immune-privileged sites such as the placenta and infects different populations of placental cells as well as endothelial cells. In this study, we investigated the influence of culture medium (conditioned medium) from chorionic villi explants, infected or not by *T. gondii*, on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). HUVEC cells were infected with *T. gondii* RH (2F1) tachyzoites and treated with conditioned medium infected or not infected with *T. gondii*. The intracellular proliferation of the parasite was analyzed by colorimetric β -galactosidase assay and cytokine dosage by ELISA. Permeability and electrical resistance (TEER) were also analyzed using fluorescence assay in transwell culture. ZO-1 protein expression was performed by immunofluorescence and ICAM-1 expression by Western blotting. Infected cells treated with conditioned medium had a high parasite load, greater production of pro-inflammatory cytokine and greater permeability in opposition to transepithelial electrical resistance. Treatment with infected or uninfected conditioned medium, as well as infection of HUVEC cells induced lower expression of ZO-1. ICAM-1 expression was altered by the conditioned medium, regardless of infection, in HUVEC cells, infected or not. Inhibition of the adhesion protein ICAM-1 increased parasite proliferation in HUVEC cells. Taken together, the data demonstrated that *T. gondii* infection and treatment with infected conditioned media alter cytokine secretion and electrical resistance, increasing cell permeability due to an alteration of ICAM-1 and decreased expression of ZO-1 thus facilitating parasitic proliferation in HUVEC cells.

Key words: *Toxoplasma gondii*, HUVEC cells, ICAM-1 expression, cytokines, cell permeability, electrical resistance and ZO-1.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gestação e placenta

A placenta é um órgão que desempenha importantes funções para a promoção do sucesso gestacional. A formação deste órgão se deve a interação entre processos interdependentes e interligados: desenvolvimento embrionário e sua implantação, bem como uma adequada decidualização (WINSHIP et al., 2015). A implantação embrionária é o processo pela qual o embrião, na fase de blastocisto, adquire um posicionamento fixo e estável na parede endometrial. O embrião nessa fase é formado por uma camada única de células epitelióides, o trofoblasto que reveste tanto a blastocela quanto o embrioblasto, que dará origem ao corpo do embrião propriamente dito. Este processo de implantação se caracteriza pelas seguintes fases: aposição, aproximação e posicionamento do blastocisto na cavidade uterina, adesão ao epitélio luminal uterino e invasão do embrião no estroma endometrial (BENIRSCHKE et al., 2006; CHAMLEY et al., 2014, BURTON; JAUNIAUX 2015). Além disso, outro fator crucial para o sucesso da implantação é a tolerância imunológica, caracterizada pelos elevados níveis de citocinas produzidas pelas células estromais endometriais, bem como por “natural killer” (células NK), células apresentadoras de antígenos (APS), células dendríticas (DCs) e macrófagos (KÄMMERER et al., 2005).

A partir do momento em que o embrião entra em contato com o epitélio uterino, durante a fase secretora do ciclo menstrual, ocorre a diferenciação das células estromais endometriais e a secreção de fatores envolvidos no processo de decidualização (DALY et al., 1983; MENDES et al., 2019). A decidualização caracteriza-se por modificações no tecido conjuntivo frouxo formando o estroma endometrial. Esta modificação é caracterizada pela transformação de uma população especial de células morfológicamente descritas como fibroblastos em células que adquirem características fenotípicas de células epiteliais. Estas novas células são poliédricas volumosas e polinucleadas e passam a ser denominadas células deciduais (FINN, 1977). O conjunto de alterações celulares que culminam com a formação de células deciduais é denominado de reação decidual ou decidualização (FINN, 1977).

Este processo é dinâmico e ocorre dentro de um espaço de tempo pré-estabelecido e notavelmente curto, durante o qual os fibroblastos endometriais adquirem progressivamente

novas características morfofuncionais, remodelamento vascular, aumento de células do sistema imunológico (GELLERSEN et al., 2007) e regulação da migração/invasão e proliferação de células trofoblásticas. Se o processo de decidualização for prejudicado, poderá levar a doenças reprodutivas como infertilidade, aborto, desordens no útero/placenta e endometriose (GELLERSEN et al., 2007; SALKER et al., 2011; BARRAGAN et al., 2016).

Após a adesão do blastocisto ao epitélio uterino decidualizado, as células trofoblásticas iniciam um processo de diferenciação formando subpopulações (BENIRSCHKE et al., 2006). As células trofoblásticas são responsáveis pelo processo de implantação do embrião e formação da parte fetal da placenta; bem como nutrição, proteção (MOORE et al., 1993) e regulação hormonal (FERRO; BEVILACQUA, 1994; FERRO, 2000; CHAMLEY et al., 2014; MAYHEW, 2014). Durante o processo de implantação, o trofoblasto que circunda externamente o blastocisto se diferencia e passa a apresentar propriedades e funções distintas. Essas células passam a ser denominadas de citotrofoblasto (HUPPERTZ et al., 2006). O citotrofoblasto posteriormente se diferencia em sinciciotrofoblasto, células multinucleadas oriunda da fusão de células do citotrofoblasto que apresentam grande capacidade invasiva e garantem a implantação embrionária (HUPPERTZ et al., 2006). Essas células são responsáveis pelo transporte de nutrientes, produção de alguns hormônios e o revestimento dos vilos flutuantes. O citotrofoblasto também se diferencia em trofoblasto extraviloso, responsável pela migração/invasão da decídua e remodelamento das arteríolas espiraladas através da substituição das células endoteliais dos vasos (KLIMAN et al., 2000). Dessa forma, o sucesso gestacional depende da implantação do blastocisto no endométrio decidualizado e sua interação principalmente com as células trofoblásticas para a formação da placenta (KLIMAN et al., 2000; LOKE; KING; BURROWS, 1995; SALAMONE et al., 2012).

1.2 Explantes placentários

A placenta é o único órgão transitório associado com a interação materno-fetal (TAKAO et al., 1990), proporcionando suporte para o crescimento e desenvolvimento do feto durante o processo gestacional. Ela é responsável pela secreção de hormônios (LOKE; KING; BURROWS, 1995), fornecimento de nutrientes e oxigênio, ajuda na excreção (BENIRSCHKE et al., 2006), na formação de um microambiente de tolerância imunológica necessária para o sucesso gestacional (ROBERT-GANGNEUX et al., 2012) e proteção contra patógenos (POLACHEK et al., 2010).

A estrutura deste órgão e a diversidade dos subtipos de trofoblasto diferem bastante entre os mamíferos, existindo quatro diferentes tipos de placentas: epiteliocorial, sinoepiteliocorial, endoteliocorial e hemocorial. A placenta humana é conhecida como hemocorial, definida pelo contato direto entre o sangue materno e células trofoblásticas. Outra característica da placenta hemocorial é a grande presença de vasos sanguíneos (BURTON et al., 1995), devido a angiogênese placentária que é essencial para a sua capacidade invasiva, alcançando profundamente a decídua e fornecendo o melhor ambiente para o crescimento do feto no útero (GUDES et al., 2004; PRATT et al., 2015; VELICKY et al., 2016). Ela é composta por uma porção materna (decídua) e outra fetal (placa coriônica). A porção decidual é constituída pelas células deciduais, derivadas de fibroblastos, que se diferenciam e formam a decídua, as quais secretam citocinas, fatores de crescimento e agentes imunomoduladores envolvidos na regulação da invasão do trofoblasto (VERMA et al., 2000). Também tem a presença de artérias uteroplacentárias, constituídas de células endoteliais, responsáveis por transportar uma quantidade suficiente de sangue, responsável por oxigenar e nutrir o feto (BURTON et al., 2009). A parte coriônica é formada pelos vilos coriônicos, que formam a própria barreira placentária, organizada em inúmeras ramificações com o objetivo de aumentar a área de superfície com o sangue materno (GUDES et al., 2004).

A interface materno-fetal é caracterizada por um complexo microambiente, constituída pelas células, sinciciotrofoblasto, o qual está diretamente em contato com o sangue materno, citotrofoblasto, mesênquima, endotélio, trofoblasto extraviloso, o qual é responsável pela ancoragem da placenta no útero (KLIMAN et al., 2000; GUDES et al., 2004) e células imunes inatas e adaptativas capazes de secretar citocinas (TOOTHAKER et al., 2020). Embora a placenta forme uma barreira contra a transmissão de diversos patógenos para o feto, muitos destes podem ser transmitidos por via transplacentária (GUDE et al., 2004, HARKER; UENO; LODOEN, 2015).

Estudos utilizando vilos placentários humanos como modelo experimental de interface materno-fetal humana são muito importantes para o entendimento dos mecanismos operantes neste microambiente após a infecção com parasitos, incluindo *T. gondii*. Este protozoário é habil para infectar o sinciciotrofoblasto, tão logo ocorra a adesão do parasita, e também a camada de células subjacentes, o citotrofoblasto (HARKER; UENO; LODOEN, 2015; ANDER et al., 2018) em diferentes períodos gestacionais (ROBBINS et al., 2012; HARKER et al., 2015). Além do mais, outros trabalhos recentes têm demonstrado que *T. gondii* infecta preferencialmente a camada composta por trofoblasto extraviloso do que a camada de

sinciciotrofoblasto, sugerindo que este parasito pode alcançar os tecidos fetais por uma via mais vulnerável da interface (ROBBINS et al., 2012; HARKER et al., 2015; COYNE e LAZEAR, 2016).

1.3 Células trofoblásticas extravilosas e a linhagem HUVEC

Como anteriormente citado, o trofoblasto é uma população celular importante da interface materno-fetal. O trofoblasto é uma célula de origem fetal que possui uma diversidade de funções que propiciam o sucesso gestacional. Primeiramente, esta célula é responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio receptivo, pela nutrição do embrião e por formar a porção fetal da placenta (FITZGERALD et al., 2008). Os trofoblastos são conhecidos como uma população celular progenitora denominada citotrofoblastos (GOLDMAN-WOHL; YAGEL, 2002; KNÖFLER, 2010, ILEKIS et al., 2016) que se diferenciam em duas grandes populações: sinciotrofoblasto e trofoblasto extraviloso (GOLDMAN-WOHL; YAGEL, 2002; KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; BALL et al., 2006) responsável pela migração/invasão da decídua e remodelamento das arteríolas espiraladas através da substituição das células endoteliais dos vasos (KLIMAN et al., 2000).

As células trofoblásticas extravilosas possuem vários subtipos presentes na decídua, dependendo de sua localização: trofoblasto extraviloso intersticial (TEVi), os quais são mononucleares, presentes no mesênquima decidual; e trofoblasto extraviloso endovascular (TEVe) presente no revestimento vascular (LYALL et al., 2013), os quais estão diretamente associados com as artérias espiraladas, remodelando-as e aumentando o diâmetro do vaso e diminuindo a resistência de fluxo sanguíneo de forma a permitir um maior fluxo de sangue para o espaço interviososo, e conseqüentemente, levando uma abundância de nutrientes para a interface materno-fetal (REDMAN; SARGENT, 2010; CHAMLEY et al., 2014; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

A migração/invasão do trofoblasto extraviloso é estimulada pela secreção de citocinas e quimiocinas pelas células deciduais (IWAHASHI et al., 1996), tendo estas a capacidade de controlar rigorosamente essa migração/invasão do trofoblasto extraviloso, para que não ultrapasse os limites da decídua e não cause patologias durante a gestação (LALA; HAMILTON, 1996; BISCHOF; MEISSER; CAMPANA, 2000; SHARMA; GODBOLE;

MODI, 2016). A correta migração/invasão do trofoblasto extraviloso em direção as artérias espiraladas é um pré-requisito para uma gestação de sucesso (PIJNENBORG et al., 1991; ; BISCHOF e IRMINGER-FINGER, 2005; NORWITZ et al., 2007; HARRIS et al 2010; WEISS et al. 2016). No momento que as células trofoblásticas extravilosas se deslocam até a decídua materna, elas invadem as artérias espiraladas e acabam por substituir as células endoteliais que revestem estas artérias. Este mecanismo de invasão vascular propicia a dilatação do calibre arterial e incapacitando o controle vasomotor materno, até o final do segundo trimestre (HUPPERTZ et al., 2005; MOSER et al., 2018).

Esta remodelação vascular está associada a um aumento de dez vezes no suprimento de sangue para a unidade feto placentária no terceiro trimestre em comparação com o útero não gravídico (BROSENS et al., 1967; BURTON et al, 2009). Inicialmente, a transformação fisiológica das artérias espiraladas inclui vacuolização endotelial e edema em células musculares lisas (ROBERTSON et al., 1975; STAFF et al; 2010). Tais alterações são ditada pelos processos imunes operantes na decídua (WHITHLEY et al., 2010; SMITH et al., 2009; TESSIER et al., 2015). Em etapa posterior, as células trofoblásticas extravilosas destroem a musculatura lisa das artérias espiraladas (BROSENS et al., 1967; BROSENS et al., 2010; PIJNENBORG et al., 2006; BROSENS et al., 1966).

A transformação fisiológica das artérias espiraladas é um processo normal (BROSENS et al., 1966; BROSENS et al., 2010) e esperado durante a correta invasão de células trofoblásticas extravilosas. Uma incorreta taxa de migração/invasão das células trofoblásticas extravilosas ou o não remodelamento das artérias espiraladas pode levar a consequências graves para a gestante e para o feto (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Uma capacidade diminuída na invasão do trofoblasto pode ocasionar complicações gestacionais como pré-eclâmpsia (LYALL et al., 2001; KAUFMANN et al., 2003) ou restrição do crescimento intrauterino (JI et al., 2013). Por outro lado, um excessivo processo de migração/invasão pode estar relacionado ao desenvolvimento da placenta acreta, quando a placenta ultrapassa o miométrio (CHAKPABORTY et al., 2002).

As células endoteliais (ECs) formam o revestimento celular mais interno dos vasos sanguíneos e linfáticos. O endotélio, além de ter um papel importante na regulação de várias funções fisiológicas, também participa de processos imunológicos/inflamatórios, incluindo a presença de leucócitos, apresentação de antígenos, regulação do sistema do complemento e remoção de complexos imunes (MEGYERI et al., 2009; JANI et al 2014). Schwaner e

colaboradores (2017) realizaram estudos com a utilização das células endoteliais da veia umbilical humana (linhagem HUVEC) para ter uma melhor compreensão dos efeitos pró-inflamatórios em relação a essas células endoteliais. Já Baudin e colaboradores (2007) executaram um protocolo para o isolamento e cultura de células HUVEC, destacando a importância das células endoteliais no controle das trocas gasosas no nível pulmonar, regulação do fluxo de células sanguíneas circulantes e de várias moléculas bioativas, por exemplo, fatores de crescimento, proteínas de coagulação, lipoproteínas e hormônios (RYAN et al., 1984; VANE et al., 1990; PARK et al., 2006).

As células endoteliais apresentam diferentes moléculas na sua membrana plasmática, permitindo uma diversidade de potencial comunicação celular com diferentes células, incluindo as células trofoblásticas (CAVALLARO; DEJANA, 2011; HARJUNPAA et al., 2019). Entre essas moléculas, as de adesão são reguladores importantes da função celular, integridade do tecido e homeostase. Esses receptores adesivos não medeiam apenas as interações célula a célula, mas também atuam através da associação com o citoesqueleto da célula e várias proteínas adaptadoras que desencadeiam eventos de sinalização intracelular em resposta a estímulos (CAVALLARO; DEJANA, 2011; HARJUNPAAL et al., 2019).

As moléculas de adesão ajudam a formar barreiras endoteliais e epiteliais por meio de transdução de sinal e interações homotípicas em junções celulares, enquanto fornecem suporte estrutural e suporte de ligação para matriz extracelular (ECM), glicocálice e muitos tipos de células residentes ou recrutadas por meio de interações nas membranas basal e apical (CAVALLARO; DEJANA, 2011). Entre essas moléculas se destaca a ICAM-1 que é uma glicoproteína de superfície celular expressa em um nível basal baixo em células imunes, endoteliais (EC) e epiteliais, mas é altamente regulada em resposta à estimulação inflamatória (HUBBARD; ROTHLEIN, 2000). Mais recentemente, alguns estudos identificaram vários novos papéis de ICAM-1 nas respostas de resolução de lesão epitelial, respostas imunes inatas e adaptativas na inflamação, tumorigênese (KONG et al., 2018) e também envolvidas em infecções por *T. gondii*, uma vez que o parasito utiliza dessa molécula no processo infecção de diferentes populações celulares (PFAFF et al., 2005).

Em células endoteliais existem as “tight junction protein” (TJs), complexos multiprotéicos de proteínas integrais de membrana (claudinas e ocludina) e proteínas de arcabouço citoplasmáticas (ZO-1, ZO-2 e ZO-3) que são encontrados em diferentes células, entre elas as da placenta e células endoteliais (SIVASUBRAMANIYAM et al., 2013). Zônula de oclusão-1 (ZO-1) foi originalmente identificado em junções *tight*, que formam uma rede

dentro das células. Esta estrutura está presente apenas na intersecção entre duas células na zona de contatocélula-célula. ZO-1 é uma proteína de membrana de 220 kDa, colocalizada com as proteínas transmembrana claudinas e ocludina (STEVENSON 1987; ANDERSON et al., 1988). ZO-1 foi demonstrado e identificado como junções aderentes que unem as células e, assim, mantêm a polaridade celular e tecidual. Além disso, essas junções ancoram o citoesqueleto, permitindo a formação de macrocomplexos na membrana plasmática. Assim como ICAM-1, diferentes estudos têm estudado a proteína ZO-1 para identificar novos papéis como, um possível biomarcador confiável de disfunção da barreira intestinal contra a sepse bacteriêmica, podendo representar uma valiosa ferramenta de prognóstico adicional para o prognóstico dos pacientes (ASSIMAKOPOULOS et al., 2020). Outro estudo tem demonstrado a participação de ZO-1 frente a infecção por ZIKA vírus, alterando a expressão da proteína de junção e aumentando a permeabilidade celular permitindo com que o vírus consiga infectar o sinciotrofoblasto e, conseqüentemente, alcance os compartimentos fetais devido a uma diminuição da expressão da proteína na célula (MIRANDA et al., 2019). Além disso, outros estudos também têm demonstrado que *T. gondii* consegue infectar células com a participação da proteína ZO-1 (BRICEÑO et al., 2016; SONG et al., 2017; MARCOS et al., 2020).

As células endoteliais podem sofrer alterações morfológicas, devido a algumas modificações na sua permeabilidade e adesão no tecido conjuntivo subjacente. Essas variações são denominadas de esfoliações, em que, quando sofrem danos, as células endoteliais estimulam moléculas de ativação (AMs) como, molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e selectina (CONGIU et al., 2010). Essas disfunções no endotélio podem ser causadas em resposta a uma variedade de estímulos como o tabagismo, diabetes, alterações genéticas, condições inflamatórias e infecção por alguns patógenos (DIMIER et al., 1993; BAUDIN et al., 1996; DOUGLAS; OHLSTEIN, 1997; LANDMESSER; DEXLER, 2004; SAEIJ et al., 2006).

O contato direto das células endoteliais com o plasma e os componentes celulares do sangue, facilita a sua exposição a várias moléculas endógenas e alguns patógenos, como *T. gondii* (LAZO et al., 1986; BAUDIN et al., 1996; SAEIJ et al., 2006; ORTIZ-ALEGRÍA et al., 2010). Na literatura existem poucos trabalhos que demonstram a interação deste parasita com as células endoteliais, principalmente as células HUVEC. Sabe-se que a infecção por *T. gondii* nas células endoteliais, constitui umas das principais vias de transmissão para o feto (DIMIER e BOUT, 1993). Os taquizoítas de *T. gondii* conseguem invadir, replicar e atravessar células endoteliais (DIMIER e BOUT 1993, 1996; BENEDETTO et al., 1997; SMITH et al., 2004;

CORTEZ et al., 2005; ZAMORA et al., 2008). Células endoteliais possuem um papel ativo em uma série de respostas imunológicas e inflamatórias, a maioria delas sob a regulamentação de citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β) (DE TITTO et al., 1986; CHANG et al., 1990; WOODMAN et al., 1991).

Alguns estudos foram realizados com o intuito de tentar compreender a invasão de *T. gondii* nas células endoteliais e os mecanismos envolvidos. Cañedo-Solares e colaboradores (2013) demonstraram que a invasão de células endoteliais por *T. gondii* é dependente das cepas do parasito. Já Dimier e Bout (1993) mostraram que os taquizoítas da cepa RH invadiram e replicaram em células HUVEC, porém quando as células foram co-tratadas com interleucina-1 β (IL-1, β) e fator de necrose tumoral (TNF), inibiram a replicação de *T. gondii*. Clough e colaboradores (2016) quiseram entender como o vacúolo do parasito é eliminado em células humanas, demonstrando que, a acidificação vacuolar leva à morte do parasito, sendo fundamental para o controle da infecção por *T. gondii* em células endoteliais humanas. Outro estudo demonstrou que a disfunção endotelial pode estimular a expressão de moléculas de adesão devido a alguns estímulos como, ICAM-1, que pode ser regulada positivamente nas células do endotélio cerebral após a infecção por *T. gondii*. Isto sugere que *T. gondii* modula a expressão de ICAM-1 em células endoteliais cerebrais e promove sua própria migração através da barreira hematoencefálica à maneira de um 'cavalo de Tróia' (BARRAGAN et al., 2005; LACHENMAIERA et al., 2014). A infecção de células endoteliais (DIMIER; BOUT, 1993; BENEDETTO et al., 1997; ZAMORA et al., 2008) é capaz de alterar a homeostase endotelial e afetar a permeabilidade do endotélio induzindo e desencadeando uma série de reações imunológicas que finalmente resultam em problemas de gravidez (DOUGLAS et al., 1997; LANDMESSER et al., 2004).

1.4 *Toxoplasma gondii*: características gerais

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa (DUBEY et al., 2010), Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidida e Família Sarcocystidae (KAWAZOE et al., 2005). Este protozoário é um parasita unicelular, eucarioto que compreende um grupo diverso de parasitos intracelulares que infectam vários hospedeiros e ocasionalmente causam doenças

graves em animais vertebrados, como aves e mamíferos, incluindo os seres humanos (HUNTER; SIBLEY, 2012). Estima-se que um terço da população humana é acometida por esta infecção, e por esta razão, é considerado um dos mais bem adaptados parasitos capaz de infectar os seres humanos (LALIBERTÈ; CARRUTHERS, 2008; DUBEY, 2010; KUL et al., 2013). Este parasito foi identificado simultaneamente no Brasil por Splendore em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), e por Nicole e Manceaux, no Norte da África, em um roedor (*Ctenodactylus gundi*), ambos em 1908 (KAWAZOE et al., 2005). Ele é caracterizado por se assemelhar às demais células eucariontes, possuindo núcleo, retículo endoplasmático, e apresentando um aspecto alongado e arqueado com a região anterior afilada e a extremidade posterior arredondada (DUBEY et al., 1998), apesar de sua morfologia depender do seu estágio de desenvolvimento (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). O parasito apresenta um complexo apical composto de organelas secretórias especializadas no processo de adesão e invasão nas células hospedeiras que favorecem seu estabelecimento e manutenção do vacúolo parasitóforo, até a replicação e sobrevivência do parasito (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; BLADER; SAEIJ, 2009; VENUGOPAL; MARION, 2018). Essas organelas incluem as roptrias, micronemas e grânulos densos; e de elementos do citoesqueleto, dentre eles, o conoide, anéis polares e microtúbulos subpeliculares (SOLDATI; MEISSNER, 2004; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Entre essas organelas que constituem o complexo apical, as micronemas são responsáveis pela adesão do parasito à célula hospedeira, e durante a motilidade do parasito e a invasão na célula hospedeira, é gerada uma cascata de sinais que desencadeiam a secreção de proteínas, como adesinas, também conhecidas como micronemas, 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). Atualmente se conhece 20 tipos de proteínas secretadas pelas micronemas (SOLDATI-FAVRE, 2008; SOUZA et al., 2010; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016), sendo a proteína de 13 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 et al., 2011).

Posteriormente a esse primeiro reconhecimento, as roptrias possuem uma região basal

mais larga e uma porção mais fina voltada para a porção apical, essas proteínas secretam moléculas proteicas que são lançados pelo conoide. As roptrias estão associadas à invasão na célula e a síntese do vacúolo parasitóforo (SOUZA et al., 2010). A secreção de proteínas pelas roptrias (ROPs) realizam uma junção de movimentos para formarem a membrana do vacúolo parasitóforo (VENUGOPAL; MARION, 2018) e, assim, o parasito penetrar ativamente pela membrana da célula hospedeira (DUBEY et al., 1998).

Os grânulos densos são essenciais na fase intracelular do parasito. Esses são organelas esféricas secretoras de glicoproteínas, conhecidas como GRA, que compõe e mantém a estrutura e integridade do vacúolo parasitóforo, além de estarem relacionadas à sobrevivência do parasito modulando respostas imune e metabólica do hospedeiro (VENUGOPAL; MARION, 2018).

T. gondii possui três estágios evolutivos, sendo eles infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (DUBLEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os taquizoítas possuem uma forma arqueada e representam a única forma de multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira, sendo predominantes na fase aguda da infecção. Nessa fase, os parasitos são disseminados pelo sistema circulatório e têm a capacidade de infectar diversos órgãos e tecidos (DUBLEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004), tais como placenta (DESMONTS et al., 1981), tecidos musculares esquelético e cardíaco, e região ocular (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012; HARKER; UENO; LODOEN, 2015). A rápida disseminação dos parasitos está relacionada à capacidade destes em infectar células do sistema imunológico que exercem funções migratórias como monócitos, linfócitos e células dendríticas (LAMBERT et al., 2006; SIBLEY, 2011). Os bradizoítas resultam da conversão de taquizoítas em um estágio de multiplicação lenta do parasito, sendo típicos da fase crônica da infecção (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002), podendo permanecer viáveis no interior dos cistos por toda a vida do hospedeiro (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Os cistos contendo bradizoítas podem ser encontrados em diferentes tecidos do hospedeiro, sendo mais frequentes nos músculos esqueléticos e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012; KAMERKAR; DAVIS, 2012). No interior dos cistos, os bradizoítas dividem por endodiogenia, caracterizada pela formação de duas células filhas no interior da célula mãe. Esta forma apresenta maior resistência as enzimas proteolíticas (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010;

ROBERT-GANGNEUX, 2014), uma vez que o *status* imunológico é comprometido, inicia-se um processo de reagudização da infecção e os bradizoítas podem retornar à forma de taquizoítas e apresentar uma rápida multiplicação (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HARKER; UENO; LODOEN, 2015). Os esporozoítas são encontrados em oocistos liberados nas fezes de felídeos, os hospedeiros definitivos do parasito (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Estes correspondem às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito e são encontrados no ambiente, podendo contaminar água, solo e alimentos (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os oocistos, dentre os três estágios infecciosos de *T. gondii*, é o mais virulento (DUBLEY, BEATTIE, 1988).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxeno por apresentar hospedeiros definitivos e intermediários. O ciclo sexuado do parasito se completa apenas pelos hospedeiros definitivos, constituídos pelos membros da Família Felidae; no entanto, o ciclo assexuado ocorre na maioria dos vertebrados endotérmicos, além do próprio hospedeiro definitivo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; KAWAZOE, 2005; SILVA; LANGONI, 2009). O hospedeiro definitivo (os felídeos) pode se contaminar ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas (DABRITZ; CONRAD, 2010; ELMORE et al., 2010; SCHLUTER et al., 2014). Os parasitos iniciam um rápido processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia, formando os merozoítas no epitélio intestinal do hospedeiro, invadindo novas células e originando os gametas masculinos e femininos, e quando fecundados formam oocistos altamente resistentes (NEVES, 2003; DUBEY, 2004). Os felídeos podem eliminar no ambiente cerca de 20 milhões de oocistos contendo esporozoítas infectantes (DUBEY, 2001). Já o homem pode adquirir a toxoplasmose por ingestão de carnes cruas ou mal cozidas de animais contendo cistos, oocistos presentes em água ou alimentos contaminados, taquizoítas presentes em líquidos orgânicos ou mesmo por transfusão sanguínea e a transmissão transplacentária (SILVA; LANGONI, 2009), em que os taquizoítas são capazes de atravessar a barreira placentária e infectar os tecidos embrionários ou fetais (CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014).

1.5 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infecção muito frequente na população humana, demonstra-se que de 10% a 90% da população mundial está infectada por esse parasito (SOMMERVILLE et al., 2013; FOROUTAN-RAD et al., 2016), isto é, estima-se que aproximadamente um terço da

população humana apresenta a fase crônica da infecção (FALLAHI et al., 2018). Entretanto, a prevalência muda muito entre diferentes países e regiões podendo estar associadas as condições socioeconômicas precárias (PAPPAS et al., 2009; CARELLOS et al., 2014). Souza e colaboradores (2011) relataram que no Brasil existe uma prevalência de até 60% de brasileiros com toxoplasmose, dependendo da região. Outro estudo demonstrou que 50% das crianças que estão no ensino fundamental e 50-80% das mulheres em idade fértil possuem anticorpos contra *T. gondii* (DUBEY et al., 2012).

O agente causador dessa zoonose pode causar um grande problema de saúde pública e econômico (SOMMERVILLE et al., 2013). A gravidade da infecção causada por *T. gondii* pode variar conforme a condição imunológica humoral e celular do indivíduo, indo de sintomas muito brandos, como mialgia, mal estar, febre, dor de cabeça (similar a uma gripe) ou ausentes. As formas clínicas graves geralmente ocorrem em indivíduos imunocomprometidos e em gestantes. Em indivíduos imunocomprometidos (HIV+, oncológicos, transplantados ou com imunodeficiências genéticas e diabetes) podem ocorrer a reativação dos bradizoítas presentes nos cistos teciduais que retornam ao estágio de taquizoítas e provocam graves problemas, como encefalite e lesões oculares (AMBROISE-THOMAS, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; JONES et al., 2014) e em alguns casos podem apresentar elevados índices de morbidade e mortalidade (HO-YEN, 1992; ISRAELSKI & REMINGTON, 1993; LEWDEN et al., 2005; KHURANA et al., 2005).

A prevenção da toxoplasmose é baseada em programas de educação e saúde pública. Recomenda-se que gestantes evitem contato com materiais que possam estar contaminados, como carnes cruas, frutas e verduras, realizando uma higienização eficiente e tomando cuidado com caixas de areia com dejetos de gatos (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; OPSTEEGH et al., 2014; SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014). No Brasil existem programas de saúde pública que visam a diminuição da mortalidade de mulheres e crianças durante o processo de gravidez e nascimento. Um exemplo é o Programa Mãe Curitiba, desenvolvido na cidade de Curitiba capital do estado do Paraná (VAZ et al., 2011). Criado em 1999, no dia internacional da mulher, este programa tem buscado melhorar o acesso e a qualidade do atendimento pré-natal, parto, puerpério, e atenção aos recém-nascidos nas unidades de saúde e maternidades. O Ministério da Saúde também tem criando programas que busquem incentivar o pré-natal e a realização de diagnósticos clínico-laboratorial nas gestantes e filhos expostos ao *T. gondii*. Porém existem muitas dificuldades relacionadas as partes técnicas e operacionais, bem como os problemas de

interpretação do diagnóstico laboratorial (VAZ et al., 2011).

1.6 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita pode ocorrer, geralmente, quando a mulher adquire a infecção durante a gestação ou quando ocorre a reativação da infecção em mulheres grávidas com toxoplasmose prévia latente (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; CHAUDHRY et al., 2014; FALLAHI et al., 2018), em razão da passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito, atingindo a circulação e os tecidos fetais (KODJIAN, 2010; CARLIER et al., 2012). Entretanto, a infecção materna pode ocorrer também no período pré-concepção e, ainda assim, ocorrer à passagem transplacentária (KODJIKIAN, 2010).

Globalmente, a incidência anual de toxoplasmose congênita é estimada em 190.100 casos (TORGERSON; MASTROIACOVO et al., 2013). No Brasil, a estimativa de relatos por ano varia entre 6.000 e 9.000 casos (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013), além disso, a cada 10.000 nascimentos de 3 a 10 recém-nascidos são diagnosticados com a toxoplasmose congênita (PIAO et al., 2018). O período gestacional em que ocorre a infecção materna é fundamental. A transmissão é mais frequente se a infecção materna for adquirida durante o terceiro trimestre de gestação, e é menor quando a infecção materna ocorre durante o primeiro trimestre, sendo sua gravidade inversamente proporcional (ZEMENE et al., 2012). O recém-nascido pode não apresentar sintomas da toxoplasmose, no entanto, em alguns anos podem aparecer sequelas como retinocoroidite, hidrocefalia ou calcificação cerebral (MONTROYA LIESENFELD, 2004; WEISS; DUBEY, 2009; VILLE; LERUEZ-VILLE, 2014).

Para o sucesso gestacional é necessário que ocorram alterações imunológicas, hormonais e fisiológicas, as quais são fundamentais na implantação embrionária e a manutenção do embrião. A principal mudança é caracterizada pelo balanço entre os perfis pró-inflamatório Th1 e anti-inflamatório Th2 do sistema imunológico (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001; FEST et al., 2007; SYKES et al., 2012). Entretanto, apesar de ser geralmente definida como uma condição predominantemente anti-inflamatória, estudos indicam que a gestação é caracterizada por basicamente três etapas imunológicas (KOGA; ALDO; MOR, 2009). No primeiro período de gestação, há um perfil imune pró-inflamatório com elevada produção de citocinas pelas células T helper do tipo 1 (Th1), de suma importância

no processo de implantação do embrião no endométrio uterino, na invasão do trofoblasto e angiogênese (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). No segundo trimestre gestacional, tem-se a fase conhecida como tolerância fetal, caracterizada pela predominância de perfil imune do tipo Th2 e de células T reguladoras (RANGO, 2008; REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012). Por fim, no terceiro trimestre gestacional, ocorre a infiltração de células imunológicas para a interface materno-fetal, designando um microambiente inflamatório necessário para o parto (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

A tolerância imunológica durante a gestação é complexa, no sentido em que o organismo materno deve manter um perfil anti-inflamatório para o sucesso gestacional (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011), que contraditoriamente pode favorecer um quadro de infecção parasitária (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001; BARBOSA et al., 2008; SYKES et al., 2012). Dessa forma, quando a gestação se dá concomitante à infecção por *T. gondii*, pode estabelecer um desequilíbrio imunológico capaz de resultar em problemas na gestação ou até mesmo aborto (LUPPI, 2003). Assim, o organismo materno na tentativa de controlar a infecção, induzindo uma resposta pró-inflamatória, acaba desfavorecendo o desenvolvimento fetal (SYKES et al., 2012).

Vários estudos do nosso grupo tentam esclarecer esse paradigma que se estabelece quando *T. gondii* se insere num processo gestacional, ou seja, qual a resposta comportamental e imunológica de células trofoblásticas mediante uma infecção por este parasito. Barbosa e colaboradores (2008) demonstraram a presença de citocinas relacionadas ao controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas da linhagem BeWo. Estas células mostraram-se ser susceptíveis à infecção por *T. gondii* na presença de interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento beta (TGF- β 1). Por outro lado, quando as células BeWo estavam na presença da citocina pró-inflamatória interferon gama (IFN- γ), a qual deveria controlar a infecção parasitária, esta não foi capaz de controlar a invasão e replicação de *T. gondii*. Castro e colaboradores (2013) evidenciaram que as células trofoblásticas são capazes de regular a produção de citocinas e a susceptibilidade de monócitos humanos (linhagem THP-1) frente à infecção por *T. gondii*. Barbosa e colaboradores (2014) observaram que a infecção por *T. gondii* em células BeWo foi controlada apenas quando altas doses do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foram adicionadas nestas células, demonstrando MIF controla a infecção por *T. gondii* em trofoblasto humano. Já Gomes e colaboradores (2011) observou este mesmo efeito de MIF em explantes de vilos placentários. Também Guirelli e colaboradores

(2015) observaram que em células trofoblásticas extravilosas da linhagem celular HTR8/SVneo, a apoptose foi modulada por *T. gondii*, uma estratégia usada pelo parasito para se estabelecer no hospedeiro.

Sabe-se que *T. gondii* tem a capacidade de modificar o microambiente para conseguir evadir do sistema imunológico e conseguir invadir as células, entre elas células endoteliais e assim podendo causar um impacto durante a gestação, prejudicando-a. Considerando que existem poucos estudos que relacionem esses dois modelos experimentais, vilos de placenta humana e células da linhagem HUVECs, durante uma infecção por *T. gondii*, propõe-se um modelo de estudo para simular a interface materno-fetal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Avaliar a influência de moléculas, presentes no meio condicionado de explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional, infectados ou não por *T. gondii*, nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) submetidas a infecção ou não por *T. gondii*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HUVEC infectadas por *T. gondii* e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;

- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;

-Avaliar a permeabilidade das células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;

- Avaliar a resistência elétrica das células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;

- Avaliar a expressão de ICAM-1 em células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;

- Avaliar a presença de ZO-1 nas células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;

- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HUVEC tratadas com o anti-ICAM-1 e tratadas com sobrenadante de explantes de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de placentas e cultura dos vilos placentários

As placentas do terceiro trimestre (36 a 40 semanas de gestação, n = 11) foram coletadas após o parto cesáreo eletivo no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU), MG, Brasil. Os critérios de exclusão incluíram pré-eclâmpsia, hipertensão crônica, doença infecciosa, incluindo toxoplasmose, corioamnionite, doença renal crônica, doença cardíaca, doença do tecido conjuntivo, diabetes *mellitus* preexistente e diabetes *mellitus* gestacional. Os tecidos placentários foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril gelado (pH 7,2) para remover o excesso de sangue e depois dissecados assepticamente usando um estereomicroscópio para remover o tecido endometrial e as membranas fetais até 1 h após a coleta. As vilosidades coriônicas terminais contendo 10 vilos placentários humanos com tamanho de 10 mm³, foram coletados (GOMES et al., 2011; CANIGGIA et al., 1997; CASTRO-FILICE et al., 2014). Os vilos placentários foram adicionados em placas de 6 poços (Cellstar, Darmstadt, Alemanha) (dez porpoço) e cultivados em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-

Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) meio completo a 37 °C e CO₂ a 5%.O comitê de ética institucional aprovou o estudo (número de aprovação: 3.136.586).

3.2 Cultura celular

A célula endotelial da veia umbilical humana (linhagem HUVEC) e o coriocarcinoma humano derivado das células trofoblásticas (linhagem BeWo) foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, Virgínia, EUA) e mantidos no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todas as células foram cultivadas ou armazenadas adequadamente em nitrogênio líquido. Essas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), 100 U/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2015).

3.3 Manutenção do clone 2F1 de *T. gondii*

Taquizoítas 2F1 de *T. gondii*, que são derivados da cepa de alta virulência (RH) e que expressam constitutivamente o gene da β-galactosidase, foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos em frascos de cultura contendo células BeWo cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 2% de SBF em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ (ANGELONI et al., 2013; BARBOSA et al., 2015). À medida que a grande maioria das células infectadas em cultura estiverem lisadas pelo parasito, os taquizoítas livres foram centrifugados (400 x g, 5 min) e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

3.4 Preparação do meio condicionado dos vilos placentários

Os vilos placentários foram processados como descrito anteriormente no item 3.1 . Os vilos foram cultivadas em duas placas de 6 poços (10 vilos placentários por poço/2000 μ L) com meio RPMI 1640 completo a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h de cultura, uma das placas de 6 poços foi infectada com taquizoítas de *T. gondii* do clone 2F1 (meio condicionado infectado/Vilo/Tg) na proporção de 1×10^7 parasitas por poço por 24 h. A outra placa de 6 poços representou o controle, onde os vilos placentários não foram infectados e receberam apenas meio (meio condicionado sem infecção/Vilo). Após 24 h, os vilos placentários foram removidos e o meio foi coletado e centrifugado por 10 min a 400 x g para remover *debris*. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante (meio condicionado) foi armazenado a -80 °C até o tratamento celular.

3.5 Proliferação intracelular de *T. gondii* nas células HUVEC

As células HUVEC foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/200 μ L/poço) em 10% de SBF a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram tratadas (150 μ L de meio condicionado infectado ou não e mais 50 μ L de meio completo a 10%) e cultivadas por mais 24 h. Após, o tratamento foi removido e as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) e incubadas em meio 2% de SBF por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle, as células foram infectadas e tratadas apenas com meio (Tg). As células foram lisadas com 100 μ L de RIPA [50 mmol/L cloridrato de Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% (v/v) Triton X- 100, 1% (p/v) sodium deoxycholate e 0,1% (p/v) SDS; pH 7,5] durante 15 min e incubado com 160 μ L de tampão de ensaio (100 mM PBS, 102 mM β -mercaptoetanol e 9 mM de MgCl₂) e 40 μ L de CPRG (*chlorophenol red-D-galactopyranoside*; Roche Diagnostic, Manheim, Alemanha). A atividade da β -galactosidase foi mensurada a 570 nm usando um leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) e os dados foram

apresentados como índice de proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítas) de acordo com a referência da curva padrão de parasitos livre (1×10^6 a $15,6 \times 10^3$), quatro experimentos independentes foram realizados em seis duplicatas (BARBOSA et al., 2014).

3.6 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

A dosagem da secreção de citocinas humanas (TGF- β , IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12 (p40), IL-8 e MIF) (BD Biosciences, San Diego, EUA; R&D Systems, Minneapolis, EUA) no sobrenadante das células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* e tratadas com o meio condicionado, infectado ou não, foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes. Resumidamente, as placas de alta afinidade para ELISA com 96 poços (Corning Cornstar Corp., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específicos por 12 h. Seguido esse período, as placas foram lavadas com PB)-Tween (PBS-T 0,05%) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS mais 1% Soro Albumina Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para MIF ou PBS mais 10% de SBF para as demais citocinas) em temperatura ambiente por 1 h. Para o ensaio de detecção de TGF- β , as amostras foram primeiramente ativadas e neutralizadas com soluções de ácido e base, uma vez que TGF- β é secretado pelas células como um complexo inativo. Assim, foram adicionadas aos 50 μ l das amostras 2 μ L de HCl 1N por 1 h e, posteriormente, foram adicionados 2 μ L de NaOH 1N para neutralizar a ação do ácido. Após lavagem das placas com PBS-T, 50 μ L das amostras ativadas ou não foram adicionadas, e paralelamente, curvas padrões foram adicionadas em duplicata com diluições seriadas e incubadas a temperatura ambiente por mais 2 h. As curvas das citocinas foram realizadas de 8000 pg/mL a 125 pg/mL para TGF- β ; 500 pg/mL a 7,8 pg/mL para IL-4, IL-10 e TNF- α ; 300 pg/mL a 4,7 pg/mL para IFN- γ e IL-6; 2000 pg/mL a 31,3 pg/mL para IL-12p40; 200 31 pg/mL a 3,1 pg/mL para IL-8; e 4000 pg/mL a 62,5 pg/mL para MIF. Em seguida, as placas foram lavadas e a placa para detecção de MIF foi incubada com anticorpo de detecção biotilado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 h e incubada com estreptavidina-peroxidase em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 20 min. As outras placas para detecção das demais citocinas foram incubadas com anticorpo de detecção biotilado conjugado com estreptavidina-peroxidase em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h. A seguir as placas foram novamente lavadas, foi adicionado 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, EUA) e a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm (Titertek Multiskan Plus, Vancouver, EUA). Os valores da DO obtidos foram

convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA).

3.7 Permeabilidade celular nas células HUVEC

A permeabilidade celular das células HUVEC foi avaliada pelo traçador FITC-Dextran, utilizando inserções de policarbonato, *transwell*, com poros de 0,4 µm de tamanho e área de crescimento de 0,3 cm² (Corning Costar Corp., Nova Iorque, NY). Foram adicionadas ao compartimento apical as células HUVEC na densidade de 1 x 10⁵ células/100 µL/por poço e apenas meio completo a 10% no compartimento de baixo, cultivado por 24 h. Depois, os meios foram retirados dos compartimentos e as células foram tratadas (75 µL de meio condicionado infectado ou não e mais 25 µL de meio completo a 10%) e cultivadas por mais 24 h. Após, o tratamento foi removido e as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) e incubadas em meio 2% de FBS por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Como controle, as células foram apenas tratadas com meio. Para avaliar a permeabilidade nas células HUVEC, foi adicionado FITC-Dextran a uma concentração de 10 mg/ml no compartimento apical do *transwell* por 1 h. O sobrenadante foi coletado dos compartimentos superior e inferior, e o FITC-Dextran foi medido em um fluorímetro (Leitor de Microplacas VersaMax ELISA; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 483 nm de excitação e 525 nm de emissão. Todos os oito experimentos independentes foram realizados em duplicata. Os valores de FITC-Dextran foram calculados a partir de uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas.

3.8 Resistência Elétrica nas células HUVEC

A resistência elétrica através das células HUVEC foi analisada utilizando inserções de policarbonato, *transwell*, com poros de 0,4 µm de tamanho e área de crescimento de 0,3 cm² (Corning Costar Corp., Nova Iorque, NY). Foram adicionados ao compartimento superior células HUVEC em uma densidade de 1 x 10⁵ células/100 µL/por poço e apenas meio completo a 10% no compartimento de baixo, cultivado por 24 h. Depois, as células foram tratadas (75 µL de meio condicionado infectado ou não e mais 25 µL de meio completo a 10%) e cultivadas

por mais 24 h. Após, o tratamento foi removido e as células foram infectadas com taquizoítas de *T.gondii* (3:1) e incubadas com meio 2% de SBF por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Como controle, as células foram tratadas apenas com meio. O uso das inserções da cultura de células permite o acesso aos lados basolateral e apical da célula, que representam os polos circulatório e luminal das células endoteliais (VAN-EIJK et al., 2006). As resistências elétricas transepiteliais (TEER) das células HUVEC foram monitoradas usando um voltímetro EVOM2 (World Precision Instruments, FL). Oito experimentos independentes foram realizados em duplicata para cada condição.

3.9 Imunofluorescência para detecção de ZO-1 em células HUVEC

As células HUVEC foram cultivadas em *chamber slide* (BD Falcon), numa concentração de $1 \times 10^4/250\mu\text{L}$ /poço por 24 h. Depois, as células foram tratadas (150 μL de meio condicionado infectado ou não e mais 50 μL de meio completo a 10%) e cultivadas por mais 24 h. Após, o tratamento foi removido e as células foram infectadas com taquizoítas de *T.gondii* (3:1) e incubadas em meio 2% de SBF por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Como controle, as células foram tratadas apenas com meio. Após o tempo de infecção, foi retirado e descartado o sobrenadante da *chamber slide*, e lavado uma vez com PBS no volume de 300 μL , após, as células foram fixadas com paraformaldeído à 4% (volume de 250 μL), e incubadas por 15 min a temperatura ambiente. Seguida da fixação, os poços foram lavados com PBS duas vezes e permeabilizadas com Triton (0,2 % de PBS) por 15 min a temperatura ambiente. O bloqueio de sítios não específicos foi feito com solução de 2% BSA e 0,2 Triton diluídos em PBS por 30 min em temperatura ambiente. Após o tempo, *chamber slide* foi incubada com os anticorpos primários e secundários: anticorpo monoclonal de rato, ZO-1 (1:1000) (Life Technologies – S36936;Thermofisher) e o TOPRO (1:500) (Life Technologies), ambos diluídos com solução de bloqueio e incubados por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida *chamber slide* foi lavada quatro vezes (5 min cada lavagem) com PBS (1x) no volume de 300 μL . Por último, as lamínulas SlowFade antifade (Life Technologies – S36936; Thermofisher) foram colocadas na *chamber slide* com 10 μL de reagente de montagem, colocadas para baixo e seladas com esmalte transparente. As lamínulas foram observadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510Meta. Quatro experimentos independentes foram realizados em duplicata para cada condição.

3.10 *Western blotting*

As células HUVEC (5×10^5 células/2000 μ L/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (Kasvi, Curitiba, Brasil) por 24 h. Posteriormente, os meios foram retirados e as células foram tratadas (1500 μ L de meio condicionado infectado ou não e mais 500 μ L de meio completo a 10%) e cultivadas por mais 24 h. Após, o tratamento foi removido e as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) e incubadas em meio 2% de SBF por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Como controle, as células foram apenas tratadas com meio. Após 24 h, os sobrenadantes livres de células foram recolhidos para medição posterior de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as células foram utilizadas para analisar a expressão de ICAM-1. As células foram homogeneizadas e lisadas em gelo em tampão RIPA (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%), desoxicolato de sódio a 1% (p/v) e dodecil sulfato de sódio a 0,1% (p / v) SDS), suplementado com inibidor de protease (Complete®, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha), ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) e fluoreto de sódio (NaF) (ambos da Sigma) e submetidos a três ciclos de congelamento-descongelamento (GOMES et al., 2011). Após centrifugação a 101 g durante 15 min a 4° C, recolheu-se o sobrenadante, mediu-se a concentração de proteína total por ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976).

A concentração total de proteínas (μ g/mL) foi utilizada para padronizar a carga proteica para as reações de *Western Blotting*. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (10%) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) com as amostras dos lisados celulares, para avaliação da expressão de ICAM-1. Em seguida, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (Imobilon-FL®, Merck S/A) e incubadas com tampão de *blotting* (25 mM Tris, 0,15 NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,4) contendo 4% de leite desnatado desidratado (Molico, Nestlé®) por 1 h. Em seguida, as membranas foram incubadas, primeiramente, com anticorpo primário policlonal de coelho de ICAM-1 (1:1000, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e anticorpo monoclonal de anti-camundongo anti- β -actina humana (Santa Cruz Biotechnology) durante 12 h em temperatura ambiente. Após consecutivas lavagens em tampão de *blotting*, os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, foram adicionados às membranas por um período de 2 h também em temperatura ambiente. Após novas lavagens com tampão de *blotting*, as membranas foram reveladas pela reação de quimioluminescência e a intensidade das bandas

quantificadas em transluminador ChemiDoc- MP imaging (BIO-RAD Laboratories Inc, Hercules CA).Quantidades iguais de proteínas (150 µg) por poço do gel de eletroforese foram confirmadas pela coloração de *Ponceau* 1%. A densitometria foi realizada usando o *software* ChemiDoc. Osvalores foram mostrados pela densidade relativa da razão das bandas específicas de cada proteína e β -actina, para análise de ICAM-1.

3.11 Bloqueio de ICAM-1 por meio do anticorpo de ICAM-1

Para confirmar o papel de ICAM-1 em relação a proliferação parasitária, em células HUVEC infectadas e tratadas com o meio condicionado infectado ou não por *T. gondii*, realizamos experimentos com um anticorpo neutralizante de ICAM-1 (anticorpo-ICAM-1) (RD Systems, BBA). As células HUVEC foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10⁴ células/200 µL/poço) em 10% de SBF a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram tratadas (150 µL de meio condicionado infectado ou não e mais 50 µL de meio completo a 10%) e cultivadas por mais 24 h. Após, o tratamento foi removido e as células foram tratadas com o anticorpo-ICAM-1 em uma concentração de 10mg/ml (24 µL) por 1 h. Após, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) e incubadas em meio 2% de SBF por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle, as células foram infectadas e tratadas apenas com meio (Tg). Subsequentemente, o ensaio da reação β - galactosidase foi realizado como descrito anteriormente.

3.12 Normas de biossegurança

Os procedimentos de cultura celular, assim como o manuseio de equipamentos, vidrarias e reagentes químicos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança (MINEO et al., 2005).

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software

Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As comparações dos dados entre os grupos foram analisadas por ANOVA One-Way, com o teste *post hoc* de comparação múltipla de *Bonferroni*. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Meio condicionado aumenta a infecção de *T. gondii* nas células HUVEC

Primeiro, verificamos a proliferação intracelular do parasita em células HUVEC tratadas com meio condicionado provenientes de vilos infectado ou não infectados por *T. gondii* (Figura 1). As células tratadas com meio condicionado provenientes de vilos não infectados mostraram um aumento no número de taquizoítas em comparação com as células infectadas e não tratadas (Tg) ($p < 0,05$, Figura 1). As células tratadas com meio condicionado proveniente de vilos infectados por *T. gondii* (Vilo/Tg) aumentaram significativamente o número de parasitas em comparação com células infectadas (Tg) e células infectadas e tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) ($p < 0,05$, Figura 1).

4.2 Células HUVEC infectadas produzem citocinas pró-inflamatórias

Após avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii*, verificamos o efeito desse meio condicionado na produção de citocinas Th1 e Th2 por células HUVEC sem infecção ou infectadas (Figura 2). Quando as células HUVEC foram tratadas com o meio condicionado sem infecção (Vilo) e infectadas por *T. gondii*, verificou-se uma produção significativamente maior de IFN- γ , em comparação com células não infectadas e não tratadas (C) ou células não infectadas e tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) ou células infectadas e não tratadas (Tg) (Figura 2A). A produção de MIF pelas células infectadas mostrou-se maior quando comparada ao meio ($p < 0,05$, Figura 2B), independentemente do tratamento ou não. As células infectadas e tratadas com meio condicionado, independente da infecção dos vilos apresentaram uma maior secreção de MIF em comparação com o respectivo tratamento nas

células não infectadas. Além disso, foi observada uma maior secreção de MIF pela condição Vilo/Tg em comparação com a Tg ($p < 0,05$, Figura 2B).

As células não infectadas e tratadas com meio condicionado, independente da infecção dos vilos, demonstraram produção reduzida de IL-12 (p40) em comparação com a condição do controle ($p < 0,05$, Figura 2C), mas quando as células foram infectadas e tratadas com o meio condicionado sem infecção (Vilo), também reduziu de maneira semelhante a produção de IL-12 (p40) em comparação com a condição do controle ($p < 0,05$, Figura 2C). Os níveis de IL-12 (p40) foram aumentados em células infectadas tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) em comparação com as células sem infecção tratadas com meio condicionado infectado ($p < 0,05$, Figura 2C). Ao mesmo tempo, as células não infectadas e tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) reduzem os níveis de TNF- α em comparação com a condição do meio ($p < 0,05$, Figura 2D), enquanto as células infectadas tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) reduzem a produção de TNF- α em comparação com células infectadas e não tratadas (Tg) ($p < 0,05$, Figura 2D). Nenhuma mudança na produção de IL-8, IL-4, IL-10, IL-6 e TGF- β foi observada sob quaisquer condições experimentais (Figura 2E-I).

4.3 A infecção por *T. gondii* e o tratamento com meio condicionado alteraram a integridade da barreira nas células HUVEC

Para entender se *T. gondii* e/ou o tratamento com meio condicionado sem infecção ou infectados alteram a permeabilidade das células HUVEC, investigamos o efeito da infecção e/ou tratamento usando FITC-Dextran em células HUVEC. Nossos resultados mostraram um aumento da permeabilidade nas células HUVEC infectadas, independentemente de as células terem sido tratadas ou não em comparação com a condição controle (C) ($p < 0,05$, Figura 3). Além disso, o tratamento com meio condicionado sem infecção (Vilo) em células não infectadas também demonstrou um aumento da entrada de FITC-Dextran na superfície apical das células HUVEC quando comparadas com a condição do controle (C) ($p < 0,05$, Figura 3). No entanto, a permeabilidade diminuiu significativamente quando células não infectadas foram tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) em comparação com células não infectadas e tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) (Figura 3).

4.4 Infecção por *T. gondii* e o tratamento com meio condicionado são capazes de alterar a resistência elétrica transepitelial

Com base nos resultados de FITC-Dextran foram avaliados os efeitos da infecção e/ou tratamento na manutenção da resistência transepitelial em células HUVEC. Observou-se diminuição da resistência elétrica nas células infectadas, independentemente se as células foram tratadas ou não com o meio condicionado sem infecção ou infectados (Vilo ou Vilo/Tg) quando comparado com a condição controle (C) ($p < 0,05$, Figura 4). Além disso, a resistência elétrica aumentou em células não infectadas tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) quando comparadas com células não infectadas tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) ($p < 0,05$, Figura 4).

4.5 As células HUVEC tratadas com os meios condicionados e infectadas por *T. gondii* diminuem a expressão de ZO-1

Posteriormente, foi analisada por imunofluorescência a presença da proteína ZO-1 nas células HUVEC sem infecção ou infectadas com *T. gondii*. Os núcleos foram corados com DAPI. Notou-se que a proteína ZO-1 é expressa em grande quantidade nas células HUVEC sem infecção e sem tratamento (Figura 5 A-I), porém, mostrou-se que a proteína diminuí significativamente quando as células HUVEC são tratadas com o sobrenadante do vilo sem infecção (Vilo) (Figura 5 A-II) e quando tratadas com o sobrenadante do vilo infectado (Vilo/Tg) (Figura 5 A-III). Na imagem A-IV notou-se que a proteína ZO-1 diminui consideravelmente nas células apenas infectadas (Tg) e que, quando essas células infectadas são tratadas com os sobrenadantes dos vilos não infectados (Vilo) e infectados (Vilo/Tg) ocorre uma maior diminuição, quase imperceptíveis da expressão da ZO-1, imagens A-V e VI, respectivamente.

4.6 O meio condicionado infectado ativa a expressão da proteína ICAM-1 nas células HUVEC

Também verificamos se a infecção e/ou tratamento estimulavam a expressão de ICAM-1 nas células HUVEC. Níveis mais altos de ICAM-1 foram observados nas células infectadas e tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) quando comparados com o controle (C), às células infectadas (Tg) e às células infectadas e tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) ($p < 0,05$ Figura 6). Por outro lado, baixos níveis de ICAM-1 foram observados em células não infectadas e tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) quando comparadas com o controle (C) ($p < 0,05$, Figura 6).

4.7 Tratamento com anticorpo neutralizante de ICAM-1, diminui a proliferação de *T. gondii* nas células HUVEC

Finalmente, avaliou-se a proliferação parasitária quando as células HUVEC foram tratadas com o anticorpo de ICAM-1 (anticorpo-ICAM-1). Nossos resultados demonstraram que, quando as células HUVEC foram tratadas com o anticorpo ICAM-1 e posteriormente infectadas, ocorreu uma diminuição da proliferação parasitária quando comparadas às células infectadas (Tg), às células infectadas e tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) e às células infectadas e tratadas com o meio condicionado não infectado (Vilo) ($p < 0,05$ Figura 7). Também foi observado um aumento da proliferação parasitária em relação às células HUVEC tratadas com o meio condicionado infectado e, posteriormente, tratadas com o anticorpo de ICAM-1 (ICAM/Vilo/Tg) em comparação com as células HUVEC infectadas e tratadas com o meio condicionado sem infecção e posteriormente tratadas com o anticorpo de ICAM-1 (ICAM/Vilo) ($p < 0,05$ Figura 7).

5. DISCUSSÃO

T. gondii é um parasita intracelular que frequentemente infecta um grande espectro de animais de sangue quente, incluindo humanos, e é responsável por causar toxoplasmose (SABIN, OLITSKY, 1937). No hospedeiro, *T. gondii* atravessa o epitélio intestinal, se espalha pelos tecidos profundos e tem a capacidade de atravessar muitas barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica e a placenta (BARRAGAN et al., 2003). A toxoplasmose pode evoluir para uma doença sistêmica grave em sua forma congênita, na qual a mãe, quando infectada pela primeira vez durante a gestação, pode apresentar uma parasitemia temporária com lesões focais geradas na placenta, e conseqüentemente, podendo infectar o feto (DUBEY et al., 1977).

Os tecidos maternos e fetais são separados por um epitélio fetal (o trofoblasto), cuja maior área é constituída pelas vilosidades, local de troca de nutrientes e gases (BENIRSCHKE et al., 1994) entre a mãe e o feto e que estão em constante contato com os vasos endoteliais maternos (JOSHI et al., 1994). *T. gondii* consegue invadir as monocamadas epiteliais e endoteliais que constituem a barreira placentária e alcança os tecidos fetais (BARRAGAN et al., 2002). Essa invasão das barreiras biológicas e a infiltração no endotélio podem envolver vários mecanismos, como produção de citocinas pró-inflamatória (WOODMAN et al., 1991), secreção de metaloproteinase-2/9 (MMP-2/9) (WANG et al., 2013); alterações na permeabilidade celular através da expressão regulada da proteína ICAM-1 (LACHENMAIERA et al., 2014), entre outros fatores. No entanto, não existem muitos estudos que indiquem a ação de *T. gondii* em células endoteliais sob influência do microambiente viloso na presença ou ausência do parasito. No presente estudo, verificamos, primeiramente, a infecção por *T. gondii* em células HUVEC tratadas com meio coletados de vilos placentários infectados ou não pelo parasita: meio condicionado sem infecção (Vilo) ou infectado (Vilo/Tg).

Nossos resultados demonstraram que as células tratadas, independente da infecção dos vilos placentários, aumentaram a replicação do parasita. Além disso, foram observadas diferenças entre os tratamentos, em que as células tratadas com meio condicionado sem infecção (Vilo) apresentaram um diminuição na replicação parasitária quando comparadas com as células tratadas com meio condicionado infectado (Vilo/Tg). Um estudo relatou os efeitos do meio condicionado retirado de vilosidades coriônicas nas células endoteliais da placenta humana

demonstrando que o meio condicionado protege as células endoteliais de lesões induzidas pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BASMAEIL et al., 2018). Além disso, outra pesquisa demonstrou que os meios condicionados de vilos placentários tem sido considerado um potencial candidato à terapia celular para reparar disfunção endotelial e prevenir complicações associadas ao diabetes (BASMAEIL et al., 2018). AHMAND & AHMED (2004) demonstraram que células endoteliais quando tratadas com meio de explante viloso induziram a migração de células endoteliais e estimularam a formação de tubos *in vitro* na placenta com pré-eclâmpsia, oferecendo um meio terapêutico, pois aumentou substancialmente angiogênese (AHMAND & AHMED, 2004). No entanto, não existem estudos na literatura usando meio condicionado de vilosidades placentárias infectadas com *T. gondii* para tratar as células endoteliais. O nosso grupo de pesquisa demonstrou que as células THP-1 quando foram tratadas com o meio condicionado de células BeWo infectadas ou não com *T. gondii* conseguiram controlar o parasitismo através da produção de MIF (CASTRO et al., 2013). Devido a esses dados anteriores nosso grupo, supôs que o meio condicionado advindo dos vilos placentários poderiam estimular a diminuição da proliferação parasitária. Com isso, podemos observar em nossos resultados que o meio condicionado não infectado ou infectados não protegeram as células HUVEC da proliferação de *T. gondii*, já que, nossos dados demonstram um aumento na proliferação do parasito. Esse aumento proliferativo é consistente com estudos na literatura que demonstram a capacidade dos taquizoítas de *T. gondii* de proliferar e aumentar sua carga parasitária em diferentes tipos de células endoteliais tratadas com meio condicionado, como células BUVEC (veia umbilical primária de bovinos), células hospedeiras multinucleadas (VELÁSQUEZ et al., 2019) e células HUVEC (WOODMAN et al., 1991).

Como o tratamento e a infecção por *T. gondii* influenciaram no aumento da proliferação de parasitas nas células HUVEC, avaliamos a produção de citocinas presentes nas células. O presente estudo demonstrou que células HUVEC infectadas e tratadas com meio condicionado sem infecção aumentaram a produção de IFN- γ . É possível supor que essa citocina seja liberada com a presença de *T. gondii* e o estímulo que está recebendo do meio condicionado sem infecção. Trabalhos anteriores mostraram o envolvimento da secreção de IFN- γ na presença de *T. gondii*, como uma alta secreção de IFN- γ por monócitos e neutrófilos durante a infecção por *T. gondii* (CARNEIRO et al., 2016), aumento da suscetibilidade de células BeWo (células trofoblásticas) à infecção por *T. gondii* (BARBOSA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2006) e conversão de estágio entre bradizoítas e taquizoítas em camundongos tratados com IFN- γ (SILVA et al., 1998). Também, há um estudo de Cortez e colaboradores (2005) analisaram

quantitativamente a infecção e multiplicação de *T. gondii* em células HUVEC na presença de IFN- γ . Este trabalho demonstrou que, na presença de IFN- γ , a expressão de NAD (P) H-oxidase poderia participar da multiplicação de *T. gondii* inibindo-a em células HUVEC.

Outro dado é que, o presente estudo mostrou que células HUVEC infectadas e tratadas ou não com o meio condicionado induziram aumento da produção de MIF. Nesse contexto, podemos sugerir que o aumento da secreção de MIF pelas células endoteliais pode estar relacionado à proliferação parasitária. Estudos demonstraram que MIF está envolvido em várias doenças e inflamações (BAKER et al., 2007; SOMMERVILLE et al., 2013) e pode modular o perfil de citocinas favorecendo o estabelecimento da infecção. Nosso grupo de pesquisa demonstrou, anteriormente que *T. gondii* é capaz de manipular as células trofoblásticas extravilosas (HTR8/SVneo) secretando MIF e, assim, aumentar a proliferação parasitária (MILIAN et al., 2019). Além disso, no presente estudo foi observada uma diminuição da produção de IL-12 (p40) e TNF- α em células HUVEC não infectadas ou infectadas, independentemente do tratamento. Vários estudos mostram que as células endoteliais são capazes de produzir IL-12 (BUCANA et al., 1988; COTRAN et al., 1988) e TNF- α (ROYALL et al., 1989; BRETT et al., 1989) em infecções como dengue (DEWI et al., 2004), toxoplasmose (BRUNTON et al., 2000) e doenças relacionadas à produção de insulina (WOTH et al., 2013). Com base nessas evidências, podemos especular que essa diminuição nas duas citocinas possa estar relacionada ao equilíbrio imunológico e a um efeito protetor, pois demonstramos aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e MIF.

Após avaliar as citocinas secretadas pelas células HUVEC e tendo o conhecimento de que essas citocinas e a proliferação parasitária podem estar relacionadas ao aumento ou diminuição da permeabilidade celular e resistência elétrica, avaliamos mais esses fatores. Observou-se que as células sem infecção ou infectadas aumentam a permeabilidade, independente do tratamento. Por outro lado, proporcionalmente a esse aumento na permeabilidade, este trabalho demonstrou que as células sem infecção ou infectadas, independente do tratamento, diminuíram a resistência elétrica celular. Esses resultados estão de acordo com observações anteriores, mostrando que citocinas pró-inflamatórias e a infecção por *T. gondii* podem prejudicar a barreira plasmática das células endoteliais.

Foi demonstrado por Dewi e colaboradores (2004) que a produção de TNF- α devido a infecção pelo vírus da dengue nas células HUVEC diminuem sinergicamente o valor da resistência elétrica nas células endoteliais, alterando a permeabilidade, uma vez que a dengue pode induzir a produção de substâncias vasoativas e resultar em aumento da permeabilidade

vascular. Também foi demonstrado que no desenvolvimento de doenças inflamatórias, como aterosclerose e esclerose múltipla, a produção de TNF- α altera as propriedades de barreira do endotélio (MARCOS- RAMIRO et al., 2014). Outro estudo observou que, os plasmas obtidos da endotoxemia humana (presença de endotoxinas no sangue) experimental aumentaram a permeabilidade endotelial *in vitro* na presença de produção de IL-12 nas células HUVEC (VAN-EIJK et al., 2006). Estudos semelhante relacionam a presença de citocinas pró-inflamatórias na alteração da barreira celular e o impacto da produção de IFN- γ no endotélio vascular alterando a função da barreira da célula devido à uma hipermeabilidade endotelial e à redução da resistência elétrica nas monocamadas (STOLPEN et al., 1986; OSHIMA et al., 2001; NG et al., 2018). Um estudo demonstrou que o IFN- γ promove uma alta permeabilidade da barreira hematoencefálica durante infecções virais, incluindo meningite pneumocócica (TOO et al., 2014). Em relação à infecção por *T. gondii*, recentemente foi proposto que as interações parasitárias com a TJ, entre elas a ocludina, influenciam a transmigração do parasita para o epitélio intestinal. Durante a infecção natural, *T. gondii* tem a capacidade de atravessar barreiras como epitélio, placenta, barreira endotelial, permitindo que o parasita viole as defesas imunológicas do hospedeiro e atinja tecidos mais profundos (JONES et al., 2017). Além disso, foi demonstrado por Ross e colaboradores (2019) que o parasita pode melhorar a permeabilidade e diminuir a estabilidade da TJ nas células, aumentando sua passagem pelas monocamadas polarizadas e favorecer sua replicação.

Esse manejo realizado por *T. gondii* indica uma ligação entre polarização, permeabilidade, frequência de transmigração parasitária e estímulos pró-inflamatórios solúveis. Sabendo da importância das junções intracelulares que são cruciais para a formação das barreiras endoteliais, o presente estudo analisou a expressão da proteína ZO-1 nas células HUVEC. Essa proteína é uma adaptadora juncional que interage com vários outros componentes juncionais, incluindo as proteínas transmembrana das famílias claudina e molécula de adesão juncional (JAM) (BAZZONI et al., 2000; EBNET et al., 2000; FANNING e ANDERSON, 2009). Observamos que as células HUVEC, que não foram infectadas e nem tratadas com os meios condicionados, apresentaram uma expressão aumentada da proteína ZO-1, isto é, a célula expressa uma grande quantidade de proteínas de junção. A presença da proteína nas células endoteliais condiz com o estudo de Tornavaca e colaboradores (2015) que demonstraram que ZO-1 está presente nas células endoteliais e que tem a ação de regular a angiogênese *in vivo* e *in vitro*, sendo essencial para a formação da barreira endotelial entre célula-célula. Porém, quando as células são apenas tratadas com o meio condicionado infectado

ou não e infectadas foi observado uma diminuição significativa da expressão da ZO-1. Com este resultado podemos sugerir que mediadores químicos, presentes nos meios condicionados estimularam uma diminuição da expressão da proteína ZO-1 nas células HUVEC. Essa análise condiz com alguns estudos que demonstram que citocinas influenciam a expressão de proteínas de junção e, conseqüentemente, alteraram a permeabilidade das células. Chuang e colaboradores (2011) investigaram a influência de MIF na expressão de ZO-1 na linhagem celular de células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1) infectadas pelo vírus da dengue. Esse trabalho sugeriu que a citocina MIF, quando induzida pela infecção do vírus contribuiu para o aumento da permeabilidade vascular e diminuição da expressão de ZO-1.

Estudo realizado por Sonar e colaboradores (2017) demonstrou que $\text{INF-}\gamma$ induziu a realocização de ICAM-1, molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1 (PECAM-1), ZO-1 e VE-caderina nas células endoteliais, o que afetou a migração de células T CD4^+ . Esses achados revelam que o $\text{INF-}\gamma$ produzido durante a inflamação pode contribuir para interromper a barreira hematoencefálica (BBB) e promover a baixa resistência elétrica das células T CD4^+ . No presente estudo foi observado que a infecção diminuiu da expressão da proteína ZO-1. Nossos resultados condizem com o estudo de Marcos e colaboradores (2020) onde foi demonstrado que a infecção por *T. gondii* pode desregular indiretamente as vias de sinalização no controle da estabilidade do vaso, afetando o potencial da célula endotelial e a formação de BBB ou interromper a expressão e organização de proteínas de junção diretamente nas células endoteliais. Outro estudo, realizado por Briceño e colaboradores (2016) também demonstrou que *T. gondii*, após a invasão, foi capaz de afetar as proteínas TJ, induzindo diminuição da expressão de ZO-1 devido a uma redistribuição de claudina-1, ocludina e ZO-1 no citoplasma das células epiteliais intestinais e conseguindo se multiplicar dentro da célula. Com isso supomos que mediadores inflamatórios podem comprometer a função de barreira nas células HUVEC, alterando a permeabilidade celular e, conseqüentemente, diminuindo a resistência elétrica. Estas podem ser uma das possíveis vias de entrada de *T. gondii* que facilita sua proliferação nestas células. Sugerimos também que o parasita, além de usar essa via de entrada, é capaz de alterar as junções celulares, aumentando a permeabilidade celular.

Por fim, avaliamos a expressão da proteína ICAM-1 em células HUVEC. A disfunção endotelial é caracterizada pela superexpressão de moléculas de adesão, incluindo ICAM-1 e VCAM-1 (HABAS and SHANG, 2018). ICAM-1 é uma molécula envolvida na transmigração

de *T. gondii* (BARRAGAN et al., 2005), podendo o parasita aumentar sua expressão (PASTRE et al., 2019). O IFN- γ induz a realocização do ICAM-1 do lado basal para o apical da monocamada endotelial e essa citocina pode aumentar a expressão do ICAM-1 na superfície das células endoteliais. Também já foi demonstrado que a expressão de ICAM-1 pode ser resgatada por MIF exógeno, relacionando o envolvimento de MIF e ICAM-1 na infecção por *P. gingivalis*, aterosclerose e periodontite (SONAR et al., 2017; HOU et al., 2019). No presente estudo, mostramos que quando as células foram infectadas e tratadas com meio condicionado infectado, observamos alta expressão de ICAM-1. Esse resultado coincide com um estudo que revelou que as células HUVEC tratadas com meio condicionado de células infectadas, como no caso do isolado clínico de citomegalovírus (HCMV), as células aumentaram a adesão leucocitárias devido ao aumento da expressão de ICAM-1 (SHAHGASEMPOUR et al., 1997). Outro estudo investigou os efeitos dos meios condicionados de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) na reprodução do vírus do Herpes simplex tipo I (HSV-1) nas células endoteliais e demonstrou que a infecção aumentou devido à expressão do ICAM-1 (SCHEGLOVITOVA et al., 2002). Também existem estudos que mostraram que a regulação positiva da expressão de ICAM-1 pode ser uma resposta às citocinas produzidas durante a inflamação (VAN DE STOLPE et al., 1996; DIETRICH et al., 2002). Além disso, vários patógenos exploram o ICAM-1 para entrar nas células (por exemplo, ronovírus e vírus coxsackie) ou se ligam especificamente ao endotélio vascular (por exemplo, *Plasmodium* spp.) (VAN DE STOLPE et al., 1996; DIETRICH et al., 2002). Nesse sentido, avaliamos a proliferação de *T. gondii* nas células HUVEC inibindo ICAM-1. Nossos resultados demonstraram que, quando as células são infectadas, tratadas com o meio condicionado infectado ou não e tratadas com o anticorpo de ICAM-1, a proliferação parasitária diminui. Estes resultados confirmam a interação e a importância que a proteína ICAM-1 tem durante uma infecção por *T. gondii*, uma vez que o parasita pode utiliza-la como via paracelular e assim atravessar eficientemente as monocamadas polarizadas (BARRAGAN et al., 2005). Deste modo, sabe-se que o ICAM-1 está presente na superfície apical de várias barreiras biológicas e que durante algumas infecções, como a presença de *T. gondii*, estimula a expressão aumentada de ICAM-1 em células humanas (KLOK et al., 1999; NAGINENI et al., 2000). Podemos supor que o aumento da expressão de ICAM-1 durante a infecção ou devido a condições inflamatórias subjacentes possa potencializar a disseminação do parasita nos tecidos placentários.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que um aumento na proliferação de *T.*

gondii ocorre quando as células HUVEC são infectadas e tratadas com meio condicionado, o que estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Que, juntamente com o parasitismo, estão relacionados o aumento da permeabilidade celular, diminuição da resistência elétrica, diminuição da expressão da proteína ZO-1, expressão de ICAM-1, e uma diminuição da proliferação do parasito quando é inibido a proteína de adesão (ICAM-1). Nesse sentido, *T. gondii* é capaz de modular sua passagem pelas células HUVEC e isso pode estar relacionado à suscetibilidade deste tipo celular ao parasito.

6. CONCLUSÕES

- Células HUVEC infectadas e tratadas com meio condicionado aumentam a proliferação de *T. gondii*;
- Células HUVEC infectadas e tratadas com o meio condicionado infectado ou não estimulou uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias;
- Células HUVEC infectadas e tratadas com o meio condicionado, independente da infecção, aumentou a permeabilidade celular;
- Células HUVEC infectadas e tratadas com o meio condicionado independente da infecção, diminuiu a resistência elétrica;
- Células HUVEC infectadas ou não e tratadas com o meio condicionado, independente da infecção diminuíram a expressão da proteína ZO-1;
- Células HUVEC infectadas ou não e tratadas com o meio condicionado, diminuíram a expressão da proteína ICAM-1;
- Células HUVEC infectadas e tratadas com o meio condicionado, independente da infecção, e tratadas com o anti-ICAM-1 diminuíram a proliferação de *T. gondii*.

7. FIGURAS

Figura 1. Replicação intracelular de *T. gondii* em células HUVEC tratadas com meio condicionado provenientes de vilos infectado ou não por *T. gondii*. As células HUVEC foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 / 200 μ L / poço), tratadas com meio condicionado não infectado (Vilo) ou meio condicionado infectado (Vilo/Tg) e infectadas com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células foram infectadas apenas com *T. gondii* (Tg). As células foram analisadas pelo ensaio de β -galactosidase. Os dados foram expressos como média \pm DP e são representativos de quatro experimentos independentes em triplicata. * Comparação com Tg. # Comparação entre Vilo e Vilo/Tg (Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 1

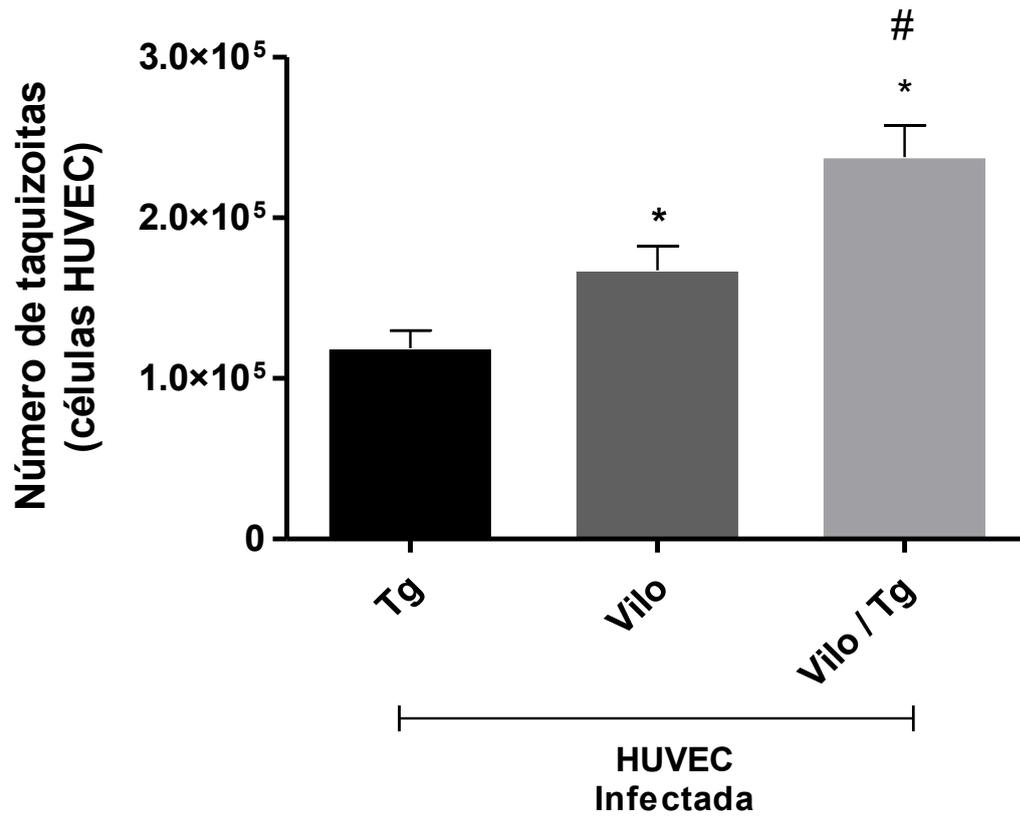
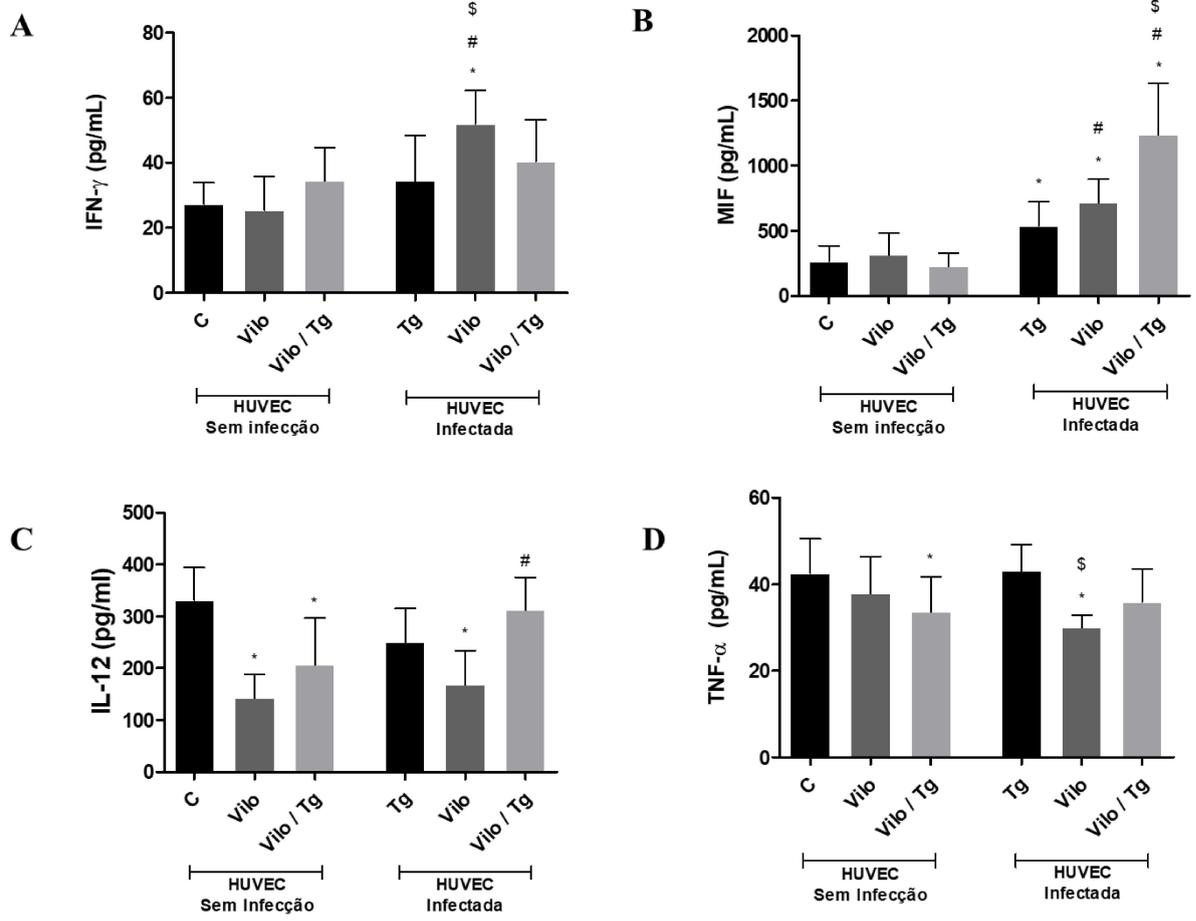


Figura 2. Produção de (A) IFN- γ , (B) MIF, (C) IL-12 p40, (D) TNF- α , (E) IL-8, (F) IL-4, (G) IL-10, (H) TGF- β e (I) IL-6 por células HUVEC sem infecção ou infectadas e tratadas com meio condicionado provenientes de vilos infectados ou não infectados por *T. gondii*. As células HUVEC foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^5 / 2000 μ L / poço), tratadas com meio condicionado não infectados (Vilo) ou meio condicionado infectados (Vilo/Tg) e infectadas (HUVEC infectadas) ou não (HUVEC sem infecção) com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células não foram infectadas e não foram tratadas (C) ou infectadas e não tratadas (Tg). Os níveis de citocinas foram determinados por ELISA em sobrenadantes livres de células. * Comparação com C. # Comparação entre células tratadas com meio condicionado não infectado (Vilo) com células infectadas e tratadas com o meio não infectado (Vilo); # Comparação entre células não infectadas e tratadas com o meio infectado (Vilo/Tg) com células infectadas e tratadas com o meio infectado (Vilo/Tg). \$ Comparação com Tg (Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 2



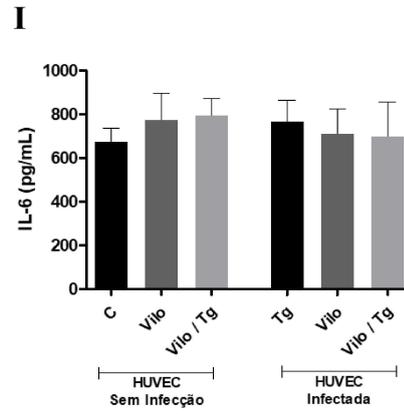
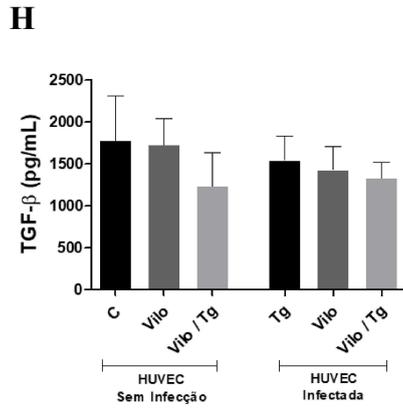
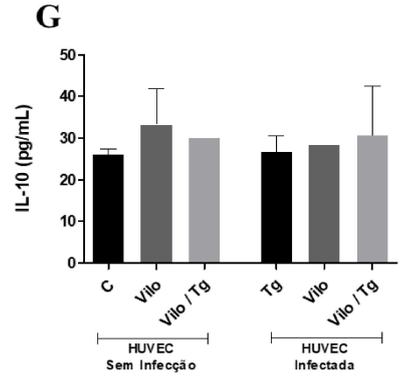
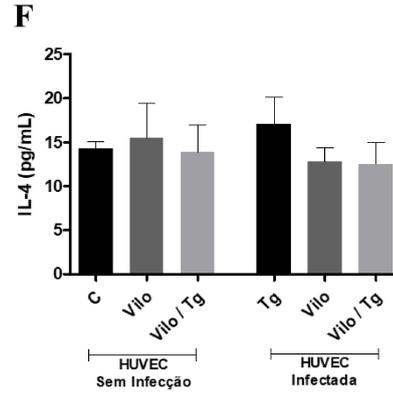
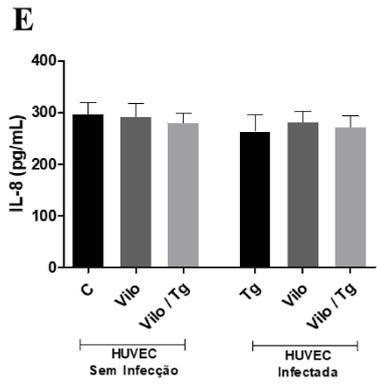


Figura 3. Permeabilidade paracelular de FITC-Dextran em células HUVEC sem infecção ou infectadas e tratadas com meio condicionado não infectado ou infectados com *T. gondii*. O ensaio de fluorescência foi realizado incubando células HUVEC em *transwell* e cultivadas em placas de 24 poços (1×10^5 / 100 μ L / poço). As células foram tratadas com meio condicionado não infectado (Vilo) ou meio condicionado infectados (Vilo/Tg) e infectadas (HUVEC infectadas) ou não (HUVEC sem infecção) com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células não foram infectadas e não foram tratadas (C) ou infectadas e não tratadas (Tg). As células foram analisadas pelo ensaio de fluorescência realizado com 1,0 mg/ml de FITC-Dextrano de 4 kDa durante 1 h. Os dados foram expressos como média \pm DP e são representativos de oito experimentos independentes em duplicata. * Comparação com C. # Comparação entre Vilo e Vilo/Tg (Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 3

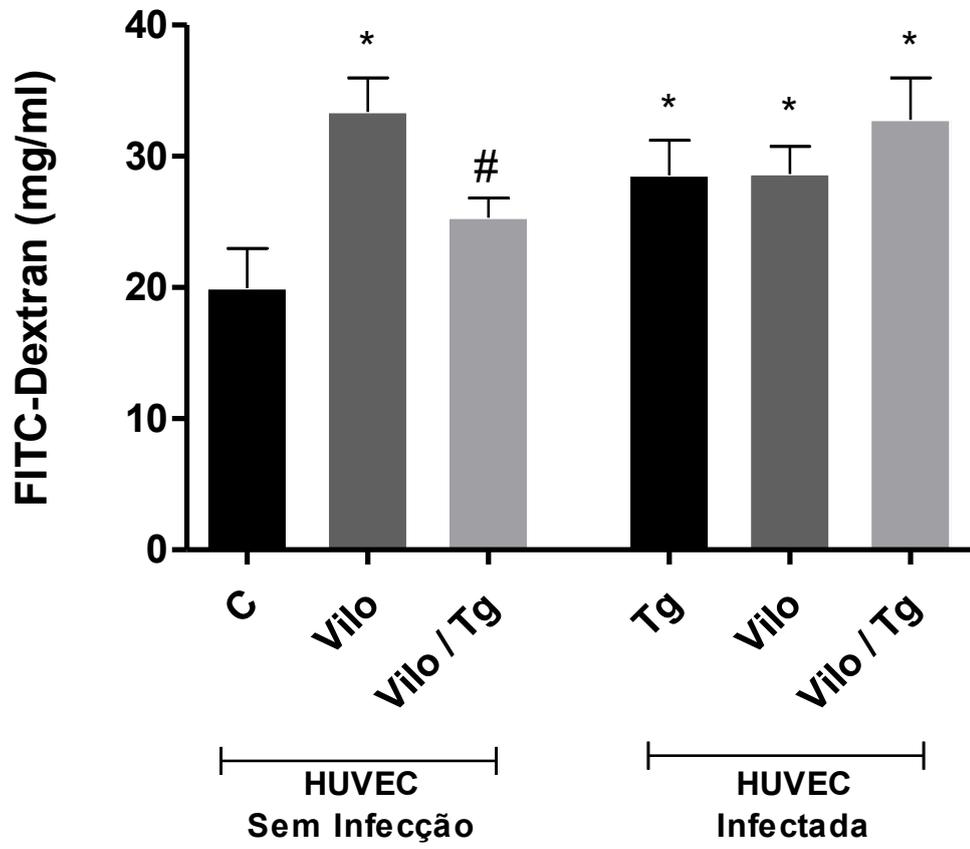


Figura 4. Resistência elétrica transepitelial (TEER) em células HUVEC sem infecção ou infectadas e tratadas com meio condicionado não infectado ou infectados com *T. gondii*. O ensaio TEER foi realizado incubando células HUVEC em *transwell* cultivadas em placas de 24 poços ($1 \times 10^5/100\mu\text{L}/\text{poço}$). As células foram tratadas com meio condicionado não infectados (Vilo) ou meio condicionado infectados (Vilo/Tg) e infectadas (HUVEC infectadas) ou não (HUVEC sem infecção) com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células não foram infectadas e não foram tratadas (C) ou infectadas e não tratadas (Tg). Os dados foram expressos como média \pm DP e são representativos de oito experimentos independentes em duplicata. * Comparação com C. # Comparação entre Vilo e Vilo/Tg (Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 4

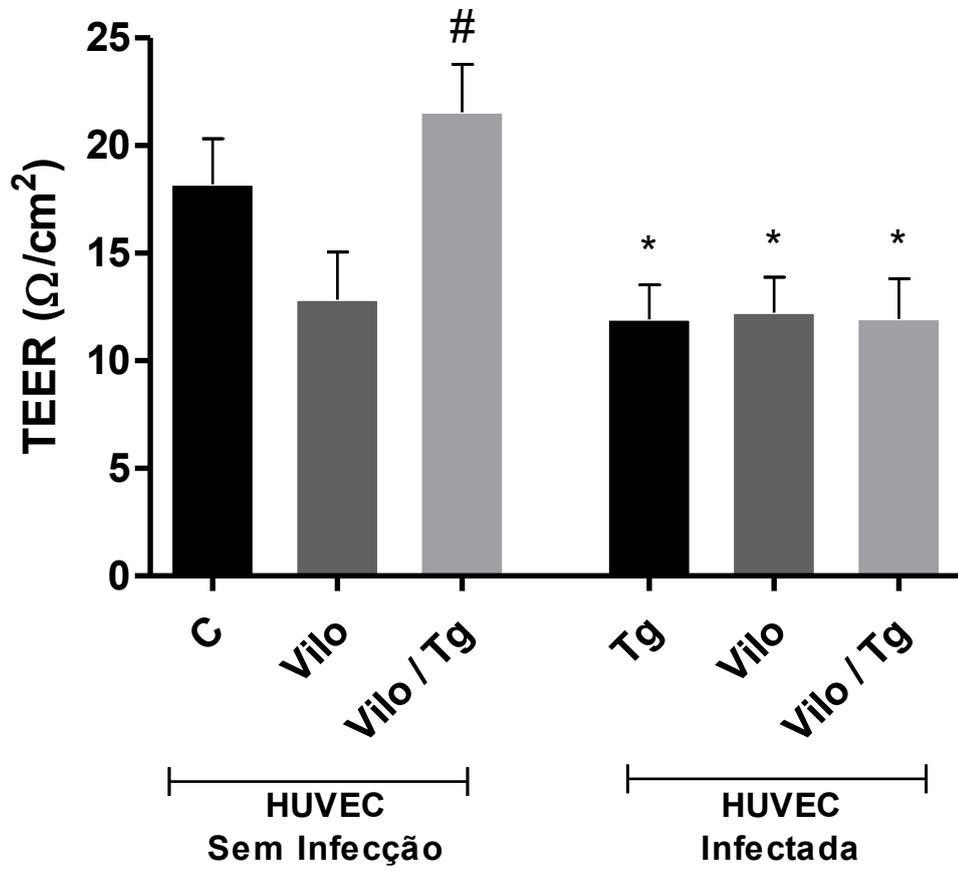


Figura 5: (A) Fotomicrografia representativa da microscopia de imunofluorescência e (B) valores médios da quantificação do sinal de fluorescência da proteína de ZO-1 em células HUVEC sem infecção ou infectadas e tratadas com meio condicionado não infectados ou infectados com *T. gondii*. As células HUVEC foram incubadas em *chamber slide* ($1 \times 10^4/250\mu\text{L}$ /poço por 24 h), tratadas com meio condicionado não infectados (Vilo) ou meio condicionado infectados (Vilo/Tg) e infectadas (HUVEC infectadas) ou não (HUVEC sem infecção) com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células não foram infectadas e não foram tratadas (C) ou infectadas e não tratadas (Tg). Os dados foram expressos como média \pm DP e são representativos de quatro experimentos independentes em duplicata. (I) Células HUVEC sem infecção e sem tratamento; (II) Células HUVEC tratadas com o sobrenadante do vilo sem infecção (Vilo); (III) Células HUVEC tratadas com o sobrenadante do vilo infectado (Vilo/Tg); (IV) Células HUVEC infectadas e não tratadas (Tg); (V) Células HUVEC infectadas e tratadas com os sobrenadantes dos vilos não infectados (Vilo); (VI) Células HUVEC infectadas e tratadas com os sobrenadantes dos vilos infectados (Vilo/Tg). Marcação da proteína ZO-1 em verde e os núcleos em azul. Barras de escala: 10 μm . * Comparação em relação ao C. # Comparação entre Vilo/Tg e Tg (Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 5

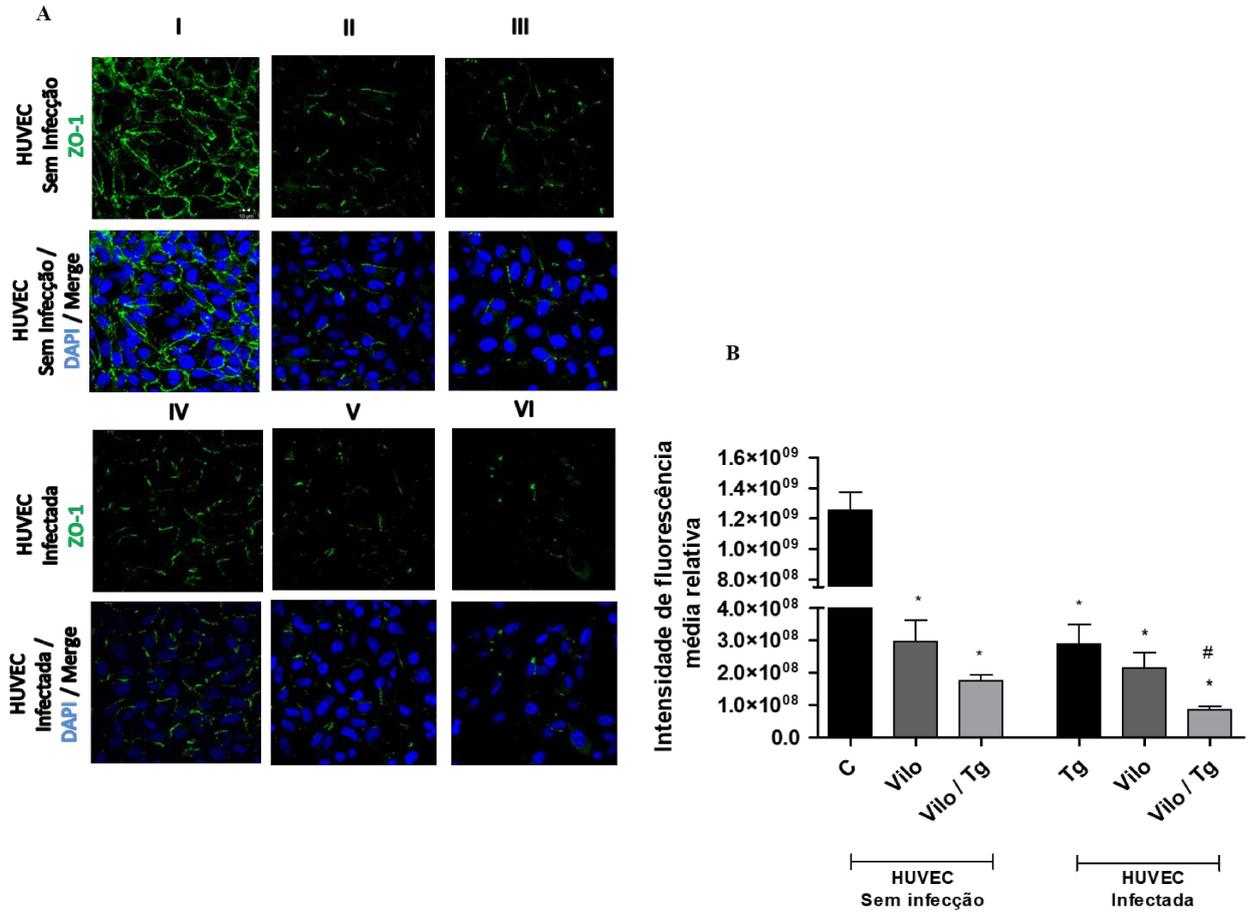


Figure 6: (A) *Immunoblotting* para detecção de ICAM-1 em células HUVEC sem infecção ou infectadas e tratadas com meio condicionado não infectado ou infectado. O ensaio de fluorescência foi realizado incubando células HUVEC em *transwell* cultivadas em placas de 6 poços ($5 \times 10^5/2000\mu\text{L}/\text{poço}$). As células foram tratadas com meio condicionado não infectado (Vilo) ou meio condicionado infectado (Vilo/Tg) e infectadas (HUVEC infectadas) ou não (HUVEC sem infecção) com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células não foram infectadas e não foram tratadas (C) ou infectadas e não tratadas (Tg). (B) Os dados quantitativos obtidos a partir da densitometria das bandas detectadas na reação de *Western blott* expressos como média \pm DP são representativos de sete experimentos independentes em duplicata. * Comparação com C. # Comparação entre células infectadas e tratadas com o meio condicionado infectado (Vilo/Tg) e células não infectadas e tratadas com o meio condicionado infectado. \$ Comparação entre Tg e Vilo/Tg. Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 6

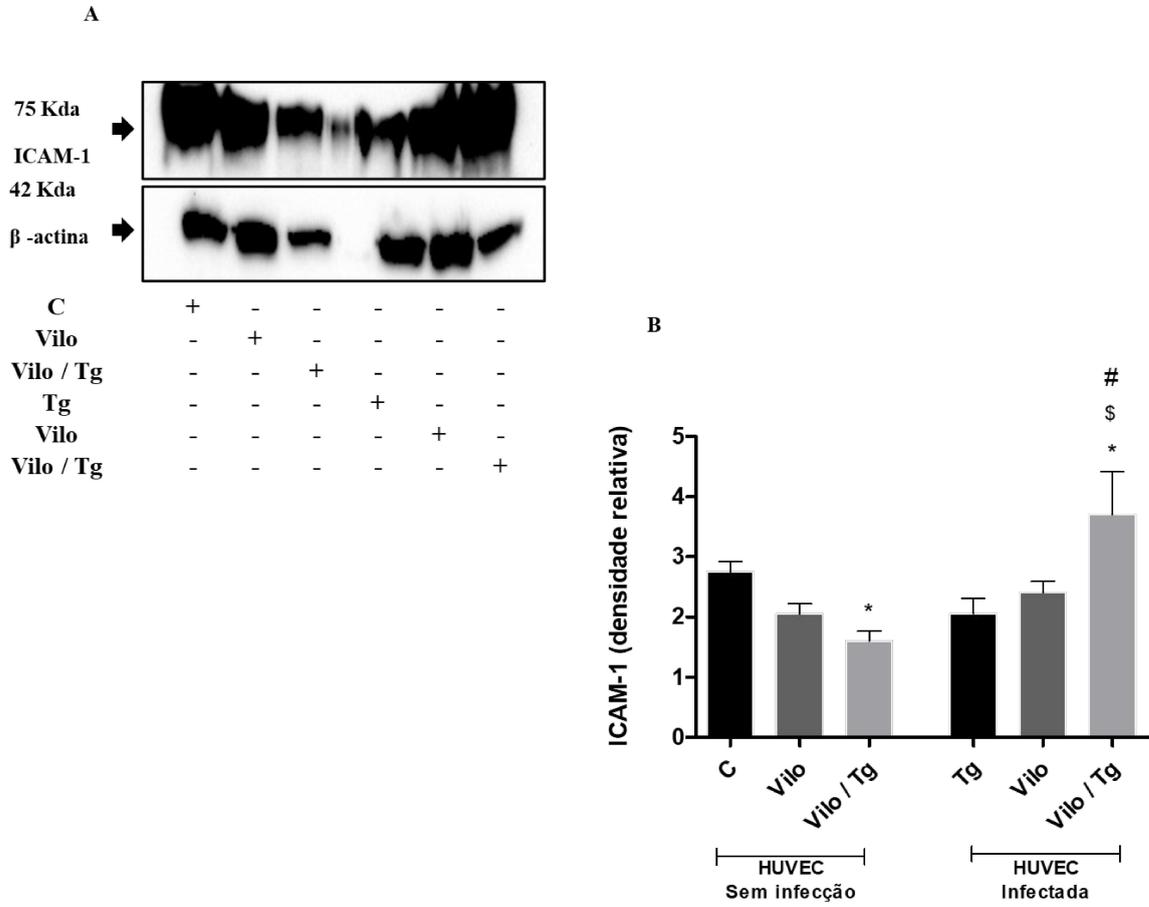
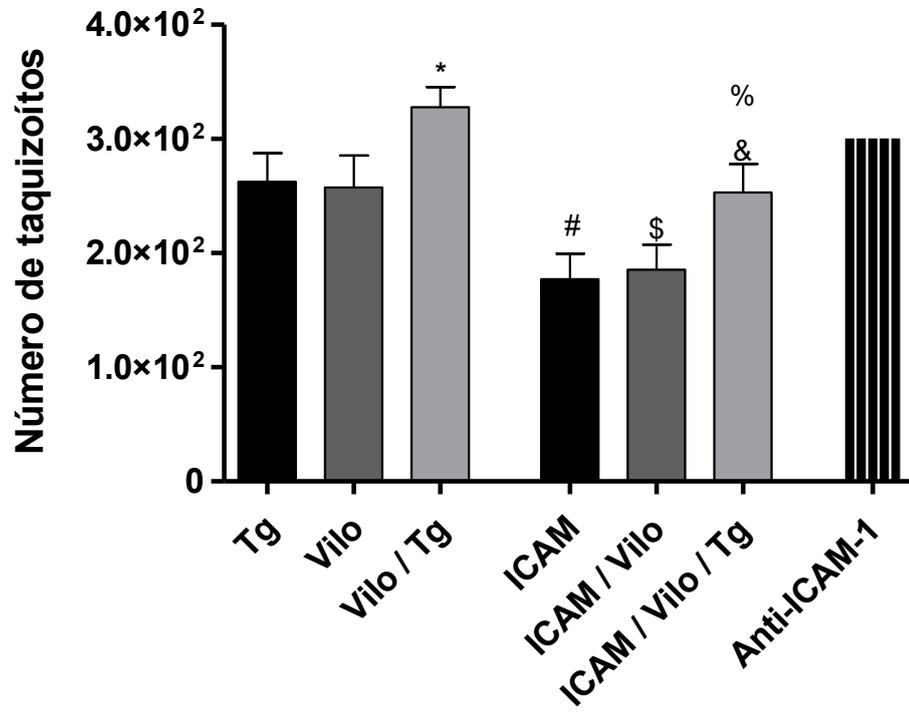


Figura 7: Replicação intracelular de *T. gondii* em células HUVEC tratadas com meio condicionado sem infecção ou infectado em conjunto com ICAM-1 ou seu anticorpo-ICAM-1. As células HUVEC foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 /200 μ L/poço) e tratadas com meio condicionado não infectado (Vilo) ou com meio condicionado infectado (Vilo/Tg) ou com ICAM-1 + meio condicionado não infectado (ICAM/Vilo) ou com ICAM-1 + meio condicionado infectado (ICAM/Vilo/Tg). Após, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*. Como controle, as células HUVEC foram infectadas e não tratadas (Tg) ou tratadas com ICAM-1 (ICAM) ou tratadas com o anticorpo de ICAM-1 (Anti-ICAM-1). As células foram analisadas pelo ensaio de β -galactosidase. Os dados foram expressos como média \pm DP e são representativos de cinco experimentos independentes em triplicata. * Comparação com Tg. # Comparação entre Tg e ICAM. \$Comparação entre Vilo e ICAM/Vilo. & Comparação entre Vilo/Tg e ICAM/Vilo/Tg. % Comparação entre ICAM e ICAM/Vilo/Tg. Teste One Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 7



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD. S. and AHMED. A. Elevated placental Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*, v. 95, p. 884-891, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147365.86159.f5>

AMBROISE-THOMAS, P. Parasitic diseases and immunodeficiencies. **Parasitology**, v. 122, p. 65-71, 2001. <https://doi.org/10.1017/S0031182000017339>

ANDER. E. S., RUDZKI. N. E., ARORA. N., SADOVSKY. Y., COYNE. B. C. BOYLE. P. B. Human Placental Syncytiotrophoblasts Restrict *Toxoplasma gondii* Attachment and Replication and Respond to Infection by Producing Immunomodulatory Chemokines. **MBio**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.01678-17>

ANDERSON. M. J., STEVENSON. B. R., JESAITIS. L. A., GOODENOUGH. D. A., MOOSEKER. M. S. Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. **J Cell Biol**, v. 106, n. 4, p. 1141–1149, 1988. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.4.1141>

ANGELONI. B. M., GUIRELLI. M. P., FRANCO. S. P., BARBOSA. F. B., GOMES. O. A., CASTRO. S. A., SILVA. M. N., MARTINS-FILHO. A. O., MINEO. W. T., SILVA. D. A., MINEO. R. J., FERRO. A. E. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, p. 82-973, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.09.005>

ASSIMAKOPOULOS. F. S., AKINOSOGLOU. K., LASTIC. A-L., SKINTZI. A., MOUZAKI. A., CHARALAMBOS. A. G. The Prognostic Value of Endotoxemia and Intestinal Barrier Biomarker ZO-1 in Bacteremic Sepsis. **Am J Med Sci**, v. 359, n. 2, p. 100-107, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.amjms.2019.10.006>

BAKER. L. N., MÖRGELIN. M., PACE. R. A., PEAT. R. A., ADAMS. N. E., DARFNER. R. J., ROWLAND. L. P., MILLER. G., DE JONGHE. P., CEULEMANS. B., HANNIBAL. M. C., EDWARDS. M., THOMPSON. E. M., JACOBSON. R., QUINLIVAN. R. C., ADTIMOS. S., KORNBERG. A. J., NORTH. K. N., BATERMAN. J. F., LAMANDÉ. S. R. Molecular consequences of dominant *Bethlem myopathy* collagen VI mutations. **Ann Neurol**, v. 62, p. 390-405, 2007. <https://doi.org/10.1002/ana.21213>

BALL. E., BULMER. J. N., AYIS. S., LYALL. F., ROBSON. S. C. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. **J Pathol**, n. 208, p. 54-535, 2006. <https://doi.org/10.1002/path.1927>

BARBOSA. B. F., SILVA. D. A. O., COSTA. I. N., MINEO. J. R., FERRO. E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clinical Experimental Immunology**, v. 151, n. 3, p. 45 - 536, Mar, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x>

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

BARBOSA. F. B., MARIA-LOPES. B. J., GOMES. O. A., ANGELONI. B. M., CASTRO. S. A., FRANCO. S. P., FERMINO. L. M., ROQUE-BARREIRA. C. M., IETTA. F., MARTINS-FILHO. A. O, SILVA. O. A. D., MINEO. R. J., FERRO. A. E. IL10, TGF beta1 and IFN gamma modulate Intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biol.Reprod**, v. 114, 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>

BARRAGAN. A and SIBLEY. L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J Exp Med**, v. 195, p. 33-1625, 2002. <https://doi.org/10.1084/jem.20020258>

BARRAGAN. A and SIBLEY. L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 4-26, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00205-1)

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, p. 8-561, 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

BARRAGAN. A., IRWIN. J. C., BALAYAN. S., ERIKSON. D. W., CHEN. J. C., HOUSHDARAN. S., PILTONEN. T. T., SPITZER. T. L., GEORGE. A., RABBAN. J. T., NEZHAT. C., GIUDICE. L. C. Human endometrial fibroblasts derived from mesenchymal progenitors inherit progesterone resistance and acquire an inflammatory phenotype in the endometrial niche in endometriosis. **Biol Reprod**, v. 5, n. 94, p. 118, 2016. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136010>

BASMAEIL. S. Y., SUBAYYIL. A. M. A., KHATLANI. T., BAHATTAB. E., AL-ALWAN. M., ABOMARAY. M. F., KALIONIS. B., ALSHABIBI. A. M., ASKAR. A. S. A., ABUMAREE. H. M. Human chorionic villous mesenchymal stem/stromal cells protect endothelial cells from injury induced by high level of glucose. **Stem Cell Res Ther**, v. 9, p. 238, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0984-0>

BAUDIN. B., BÉNÉTEAU-BURNAT. B., GIBOUDEAU. J. Cytotoxicity of amiodarone in cultured human endothelial cells. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 5, n. 10, p. 60-557, 1996.

<https://doi.org/10.1007/BF00050996>

BAUDIN. B., BRUNEEL. A., BOSSELUT. N., VAUBOURDOLLE. M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. **Nat Protoc**, n. 2, p. 48-481, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>

BAZZONI. G., MARTINEZ-ESTRADA. M. O., ORSENIGO. F., CORDENONSI. M., CITI. S., DEJANA. E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. **J Biol Chem**, v. 275, n. 27, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M905251199>

BENEDETTO. N., FOLGORE. A., FERRARA. C., MOLITIERNO. M., GALDIERO. F. Effects of alpha-adrenergic and beta-adrenergic agonists on *Toxoplasma gondii* replication in human umbilical vein endothelial cells. **Pathol Biol**, n. 45, p. 9-18, 1997. <https://doi.org/10.1645/GE-3242RN>

BENIRSCHKE. K. Anatomical relationship between fetus and mother. **Ann N Y Acad Sci**, v.7, p. 9-20, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb55744.x>

BENIRSCHKE. K., KAUFMANN. P., BAERGEN. R. N. Pathology of the human placenta. 5th ed. edição, **New York: Springer**, p.16-24, 2006.

BISCHOF. P., MEISSER. A., CAMPANA. A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion: a review. **Placenta**, v. 21 Suppl A, p. S55-60, Jan. 2000. <https://doi.org/10.1053/plac.2000.0521>

BISCHOF. P., IRMINGER-FINGER. I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 1, n. 37, p. 1-6, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.014>

BLADER. I. J., SAEIJ. J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact

on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 5-6, n. 117, p. 76-458, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x>

BOJAR. I., SZYMANSKA. J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*-state of the art. **Ann Agric Environ Med**, v. 2, n. 17, p. 14-209, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, May. 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRETT. J., GERLACH. H., NAWROTH. P., STEINBERG. S., GODMAN. G., STERNS. D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. **J. Exp. Med**, v. 169, p. 1977-1991, 1989. <https://doi.org/10.1084/jem.169.6.1977>

BRICEÑO. P. M., NASCIMENTO. A. L., NOGUEIRA. P. N., BARENCO. V. P., FERRO. A. E., REZENDE-OLIVEIRA. K., GOULART. R. L., ALVES. T. P., BARBOSA. F. B., LIMA. R. W., SILVA. M. N. *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells. **J Histochem Cytochem**, v. 64, n. 8, p. 69-459, 2016. <https://doi.org/10.1369/0022155416656349>

BROSENS. I., DIXON. H. G. The anatomy of the maternal side of the placenta. **J Obstet Gynaecol**, v. 3, n. 73, p. 63-357, 1966. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1966.tb05175.x>

BROSENS. I., ROBERTSON. W. B., DIXON. H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. **J Pathol Bacteriol**, n. 93, p. 569-579, 1967. <https://doi.org/10.1002/path.1700930218>

BROSENS. I., DERWING. I., BROSENS. J., FUSI. L., BENAGIANO. G., PIJNENBORG. R. The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and

major obstetrical disorders? **Hum Reprod**, v. 3, n. 25, p. 74-569, 2010.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dep474>

BRUNTON. L. C., WALLACE. G. R. GRAHAM. E., STANFORD. M. R. The effect of cytokines on the replication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 102, p. 182-188, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00167-8)

BUCANA. D. C., TRIAL. J., PAPP. A. C., WU. K. K. Bovine aorta endothelial cell incubation with interleukin 2: morphological changes correlate with enhanced vascular permeability. **Scanning Microsc**, v. 2, p. 1559-1566, 1988.

BURTON. G. J., JAUNIAUX. E. Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. **Br. J. Obstet. Gynaecol**, v. 102, n. 10, p. 818-825, 1995.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1995.tb10849.x>

BURTON. G. J., CHARNOCK-JONES. D. S., JAUNIAUX. E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. **Reproduction**, v. 138, p. 895-902, 2009.
<https://doi.org/10.1530/REP-09-0092>

BURTON. G. J., JAUNIAUX. E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics e Gynecology**, v. 213, suppl. 4, S6,1, S6-8, Oct., 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>

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

CARELLOS. E. V. M., ANDRADE. G. M. Q., VASCONCELOS-SANTOS. D. V., JANUÁRIO. J. N., ROMANELLI. R. M. C., ABREU. M. N. S., SILVA. F. M., LOURES. I. R. C., ANDRADE. J. Q., CAIAFFA. W. T. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associates with congenital toxoplasmosis in a population-based study in

Minas Gerais, Brazil. **PlosOne**, v. 9, n. 2, p. 88588, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088588>

CARLIER. Y., TRUYENS. C., DELORON. P., PEYRON. F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Trop**, v. 121, p.55-70, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.018>

CARNEIRO. V. A. C. A., MACHADO. S. A., BÉÇA. R. S., COSTA. L. G. J., ANDRADE. Q. M. G., VASCONCELOS-SANTOS. V. D., JANUÁRIO. N. J., COELHO-DOS-REIS. G. J., FERRO. V. A. E., TEIXEIRA-CARVALHO. R. W. A. V., MARTINS-FILHO. A. O. Cytokine Signatures Associated with Early Onset, Active Lesions and Late Cicatricial Events of Retinochoroidal Commitment in Infants with Congenital Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, p. 1962-1970, 2016. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw041>

CARRUTHERS. V., BOOTHROYD. J. C. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83-9, fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>

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

CASTRO-FILICE. L. S., BARBOSA. B. F., ANGELONI. M. B., SILVA. N. M., GOMES. A. O., ALVES. C. M. O. S., SILVA. D. A. O., MARTINS-FILHO. O. A., SANTOS. M. C., MINEO. J. R., FERRO. E. A. V. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **J. Trans. Med**, v. 132, n. 12, p. 1-12, 2014. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-132>

CAVALLARO. U and DEJANA. E. Sinalização de molécula de adesão: nem sempre um negócio pegajoso. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 12, p. 189-197, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrm3068>

- CAÑEDO-SOLARES. I., CALZADA-RUIZ. M. ORTIZ-ALEGRÍA. B. L., ORTIZ-MUÑIZ. R. A., CORREA. D. Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains. **Parasitol Res**, n. 112, p. 3029-3033, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3476-2>
- CONGIU. T., SCHEMBRI. L., TOZZI. M., GUAISTI. L., MAIO. R. C. COSENTINO. M. MARINO. F. Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques, **Micron**. v. 41, p. 532-536, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.01.006>
- CORTEZ. E., STUMBO. A. C., DE CARVALHO. T. M., BARBOSA. H. S., CARVALHO. L. NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. **J Parasitol**, n. 91, p. 1052–1057, 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-467R1.1>
- COTRAN. S. R., POBER. J. S., GIMBRONE. M. A., SPRINGER. T. A., WIEBKE. E. A., GASPARI. A. A., ROSENBERG. S. A., LOTZE. M. T. Endothelial activation during interleukin 2 immunotherapy: A possible mechanism for the vascular leak syndrome. **J Immunol**, v. 140, p. 1883-1888, 1988.
- COWPER. B., MATTHEWS. S., TOMLEY. F. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 186, p. 1-10, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.08.007>
- COYNE. B. C and LAZEAR. M. H. Zika virus — reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 715-707, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125>
- CHA. J., SUN. X., DEY. S. K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. **Nat Med**, v. 18, p. 1754-1767, 2012. <https://doi.org/10.1038/nm.3012>
- CHAKRABORTY. C., GLEESON. L. M., MCKINNON. T., LALA. P. K. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 2, n. 80, p. 24-

116, 2002. <https://doi.org/10.1139/y02-016>

CHAMLEY, L. W., HOLLAND. O. J., CHEN. Q., VIAL. C. A., STONE. P. R., ABUMAREE. M. Review: where is the materno interface? **Placenta**, v. 35, suppl. S75-80, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.014>

CHANG. H. R., GRAU. G. E., PECHERE. J. C. Role of TNF and IL-I infections with *Toxoplasma gondii*. **Immunology**, v. 69, n. 33, 1990.

CHAUDHRY. S. A., GAD. N., KOREN. G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Canadian Family Physician**, v. 60, n. 4, p. 334-6, Apr. 2014.

CHUANG. Y. C., LEI. H. Y., LIU. H. S., LIN. Y. S., FU. T. F., YEH. T. M., YEH. T. M. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 222-231, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.01.013>

CLOUGH. B., WRIGHT. J. D., PEREIRA. P. M., HIRST. E. M., JOHNSTONS. A. C., HENRIQUES. R. Ubiquitination Targets *Toxoplasma gondii* for Endo-lysosomal Destruction in IFN γ -Stimulated Human Cells. **PLoS**, v. 11, n. 12, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006027>

DABRITZ. H. A., CONRAD. P. A. Cats and Toxoplasma: implications for public health. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 34-52, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01273.x>

DALY. D. C., MASLAR. I. A., RIDDICK. D. H. Term decidua response to estradiol and progesterone. **AM J Obstet Gynecol**, v. 6, n. 145, p. 83-679, 1983. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(83\)90573-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(83)90573-2)

DE TITTO. E. H., CATTERALL. J. R., REMINGTON. J. S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol**, n. 137, p. 1342, 1986.

DESMONTS. G., NAOT. Y., REMINGTON. J. S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **J Clin Microbiol**, n. 14, p. 486–491, 1981. <https://doi.org/10.1128/jcm.14.5.486-491.1981>

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

DIETRICH. B. J. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood–brain barrier. **J Neuroimmunol**, v. 128, p. 58-68, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00114-5)

DIMIER. I. H., BOUT. D. T. Cooperation of interleukin-1b and tumor necrosis factor-ain the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. **Immunology**, n. 79, p. 336– 338, 1993.

DOUGLAS. A. S and OHLSTEIN. H. E. Signal transduction mechanisms mediating the vascular action of endothelin. **J. Vasc. Res**, v. 34, p. 152-164, 1997. <https://doi.org/10.1159/000159219>

DUBEY. J. P., CHRISTIE. E., PAPPAS. W. P. Characterization of *Toxoplasma gondii* from the feces of naturally infected cats. **J Infect Dis**, v. 136, p. 5-432, 1977. <https://doi.org/10.1093/infdis/136.3.432>

DUBEY. J. P., BEATTIE. C. P. Toxoplasmosis of Animals and Man. **CRC Press**, p. 1-220, 1988.

DUBEY. J. P., LINDSAY. D. S., SPEER. C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267 - 99, Apr, 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUBEY. J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 215–219, 2001. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0215:OSBCFI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0215:OSBCFI]2.0.CO;2)

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

DUBEY. J. P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. **CRC Press**, 2010.

DUBEY. J. P., HILL. D. E., ROZEBOOMB. D. W., RAJENDRANA. C., CHOUDHARYA. S., FERREIRA. A. L. R., KWOKA. O. C. H., SUC. C. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, Sep, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

EBNET. K., SCHULZ. C. U., MEYER. Z., BRICKWEDDE. M. K., PENDL. G. G., VESTWEBER. D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. **J Biol Chem**, v. 275, p. 27979–27988, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002363200>

ELMORE. S. A., JONES. J. L., CONRAD. P. A., PATTON. S., LINDSAY. D. S., DUBEY. J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol**, v. 26, p. 190-196, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

FANNING. S. A and ANDERSON. M. J., Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1165, p. 20-113, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x>

FERRO. E. A. V., BEVILACQUA. E. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae). **Journal of Morphology**, v. 221, n. 2, p. 139-152, Aug, 1994. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052210204>

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

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

FEST. S., ALDO. P. B., ABRAHAMNS. V. M., VISINTIN. I., ALVERO. A., CHEN. R., CHAVEZ. S. L., ROMERO. R., MOR. G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory net work for the protection of pregnancy. **American Journal Immunology**, v. 57, n. 1, p. 55-66, Jan. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x>

FINN. A. C. The implantation reaction. **Biology of the Uterus**, p. 245-308, 1977. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2271-9_9

FITZGERALD. J. S., POEHLMANN. T. G., SCHLEUSSNER. E., MARKERT. U. R. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3). **Hum. Reprod. Update**, v. 14, n. 4, p. 335-344, 2008. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn010>

FOROUTAN-RAD. M., MAJIDIANI. H., DALVAND. S., DARYANI. A., KOOTI. W., SAKI. J., HEDAYATI-RAD. F., AHMADPOUR. E. Toxoplasmosis in blood donors: A systematic review and meta-analysis. **Transfusion Medicine Review**, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.tmr.v.2016.03.002>

GATHIRAM. P., MOODLEY. J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology.

Cardiovascular Journal of Africa, v. 27, n. 2, Mar-Apr. 2016. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2016-009>

GELLERSEN. B., BROSEN. I. A., BROSEN. J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and critical perspectives. **Semin Reprod Med**, v. 25, p. 445-453, 2007.

<https://doi.org/10.1055/s-2007-991042>

GOLDMAN-WOHL. D., YAGEL. S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 233-8, Feb. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00687-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00687-6)

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>

GUDES. M. N., ROBERTS, T. C., KALIONIS. B., KING. G. R. Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis Research**, v. 114, p. 397-407, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>

GUIRELLI. P. M., ANGELONI. M. B., BARBOSA. B. F., GOMES. A. O., CASTRO. A. S., FRANCO. P. S., SILVA. R. J., OLIVEIRA. J. G., MARTINS-FILHO. O. A., MINEO. J. R., IETTA. F., FERRO. E. A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v.36, n.10, p.1106-14, Oct. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.009>

HABAS. K. and SHANG. L. Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells. **Tissue Cell**, v. 54, p. 139-143, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.09.002>

HARKER. K. S., UENO. N., LODOEN. M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 3, p. 9-1419, Mar, 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12163>

HARRIS. L. K. Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. **Placenta**, n. 31, p. S93-S98, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.012>

HARJUNPAA. H., ASENS. M. L., GUENTHER. C., FAGERHOLM. S. C. Moléculas de adesão celular e seus papéis e regulação no microambiente imunológico e tumoral. **Front Immunol**, v. 10, p. 1078, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01078>

HOU. J., LIU. Y., XUE. X., WU. Y., LI. R., XU. T., ZHANG. D. The expression of macrophage migration inhibitory factor and intercellular adhesion molecule-1 in rats with periodontitis and atherosclerosis. **Archives of Oral Biology**, p. 104513, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104513>

HO-YEN. D. O., JOSS. A. W., BALFOUR. A. H., SMYTH. E. T., BAIRD. D. CHATTERTON. J. M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 10, p. 910-913, 1992. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.10.910>

HUBBARD. K. A and ROTHLEIN. R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biol Med**, v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00223-9)

HUNTER. C., SIBLEY. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors, v. 10, p. 766 - 776, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>

HUPPERTZ. B., PEETERS. L. L. Vascular biology in implantation and placentation. **Angiogenesis**, n. 8, p. 157-167, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-9007-8>

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

ILEKIS. J. V., TSILOU. E., FISHER. S., ABRAHAMS. V. M., SOARES. M. J., CROSS. J. C., ZAMUDIO. S., ILLSLEY. N. P., MYATT. L., COLVIS. C., COSTANTINE. M. M., HAAS. D. M., SADOVSKY. Y., WEINER. C., RYTTING. E., BIDWELL. G. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: An executive workshop summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. **Am J Obstet Gynecol**, n. 215, p. S1-S6, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.03.001>

ISRAELSKI. D. M. & REMINGTON. J. S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 423-435, 1993. https://doi.org/10.1093/clinids/17.Supplement_2.S423

IWAHASHI. M., MURAGAKI. Y., OOSHIMA. A., YAMOTO. M., NAKANO. R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. **J Reprod Fertil**, v. 108, p. 147-155, 1996. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080147>

JANI. P. K., KAJDÁCSI. E., MEGYERI. M., DOBÓ. J., DOLESCHALL. Z., FUTOSI. K., TÍMÁR. C. I., MÓCSAI. A., MAKÓ. V., GÁL. P., CCERVENAK. L. MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: a novel link between complement system and neutrophil granulocytes. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087104>

JI. L., BRKIC. J., LIU. M., FU. G., PENG. C., WANG. Y. L. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. **Mol Aspects Med**, v. 5, n. 34, p. 981-1023, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.008>

JIMENEZ-RUIZ. E., MORLON-GUYOT. J., DAHER. W., MEISSNER. M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Mol Biochem Parasitol**, in Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.007>

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>

JONES. J. E., KORCSMAROS. T., CARDINGA. R. S. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. **Tissue Barriers**, v. 5, p. 11, 2017. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1273865>

JOSHI. V. V. Handbook of placental pathology. **New York: Igaku-Shoin**, 1994.

KHURANA. S., DUBEY. M. L., MALLA. N. Association of Parasitic Infections and cancers. **Ind J Med Microbiol**, v. 23, n. 2, p. 74- 79, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02644-X](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02644-X)

KAMERKAR. S., DAVIS. P. H. Toxoplasma on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. **J Parasitol Res**, p. 589295, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/589295>

KÄMMERER. U. Antigen-presenting cells in the decidua. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 89, p. 96-104, 2005. <https://doi.org/10.1159/000087951>

KASPER. L. H., BUZONI-GATEL. D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitol Today**, England, v. 14, n. 4, p. 150 - 156, Apr, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01212-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01212-X)

KAUFMANN. P., BLACK. S., HUPPERTZ. B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology**

of **Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 1-7, Aug, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014977>

KAWAZOE. U. D. P., MELO. A. L., LINARDI. P. M., VITOR. R. W. A. *Toxoplasma gondii*. *Parasitologia Humana*, v. 11, p. 147 - 56, 2005.

KLOK. M. A., LUYENDIJK. L., ZAAL. M. J., ROTHOVA. A., KIJLSTRA. A. Soluble ICAM-1 serum levels in patients with intermediate uveítis. **Br J Ophthalmol**, v. 83, p. 847-851, 1999. <https://doi.org/10.1136/bjo.83.7.847>

KODJIKIAN. L. Toxoplasmosis and pregnancy. **J Fr Ophtalmol**, v. 5, n. 33, p. 7-362, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2010.03.002>

KOGA. K., ALDO. P. B., MOR. G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 35, n. 2, p. 191 - 202, Apr, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x>

KONG. H. D., KIM. R. M., JANG. H. J., 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. 1057, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>

KNÖFLER. M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int. J. Dev. Biol*, n. 54, p. 269–280, 2010. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082769mk>

KLIMAN. H. J. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. **Am J Pathol**, v. 157, p. 1759 –1768, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64813-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64813-4)

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>

LACHENMAIERA. M. S., DELIB. A. M., MEISSNERC. M., LIESENFELDA. O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **J NeuroImmunol**, v. 232, p. 119-130, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.029>

LALA. P. K., HAMILTON. G. S. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. **Placenta**, v. 17, n. 8, p. 545-55, Nov, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(96\)80071-3](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(96)80071-3)

LALIBERTÈ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>

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, p. 1611 - 1623, 2006.s <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>

LANDMESSER. U and DEXLER. H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**, v. 109, p. 21, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f>

LAZO. J. S., LYNCH. T. J., MCCALLISTER. J. Bleomycin inhibition of angiotensin-converting enzyme activity from serum, lungs, and cultured pulmonary artery endothelial cells. **Am Rev Respir Dis**, v. 1, n. 134, p. 8-73, 1986.<https://doi.org/10.1164/arrd.1986.134.1.73>

LEWDEN. C., SALMON. D., MORLAT. P., BÉVILACQUA. S., JOUGLA. E., BONNET. F., HÉRIPRET. L., COSTAGLIOTA. D., MAY. T., CHÊNE. G. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy:

emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. **Intl J Epidemiol**, v. 34, n. 1, p. 121-130, 2005. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh307>

LOKE. Y. W., KING. A., BURROWS. T. D. Decidua in human implantation. **Human Reproduction**, v. 10, Suppl 2, p. 14-21, Dec, 1995. https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_2.14

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

LYALL. F., BULMER. J. N., DUFFIE. E., COUSINS. F., THERIAULT. A., ROBSON. S. C. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. **Am J Pathol**, v. 5, n. 158, p. 21-1713, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64127-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64127-2)

LYALL. F., ROBSON. S. C., BULMER. J. N. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. **Hypertension**, v. 6, n. 62, p. 1046–54, 2013. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01892>

LYONS. R. E., MCLEOD. R., ROBERTS. C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v.18, p. 198 -201, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02248-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02248-1)

MARCOS-RAMIRO. B., GARCÍA-WEBER. D., MILLÁN. J. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond action and Rho. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 112, p. 102-1088, 2014. <https://doi.org/10.1160/th14-04-0299>

MARCOS. C. A., SIQUEIRA. M., ALVAREZ-ROSA. L., CASCABULHO. M. C., WAGHABI. C. M., BARBOSA. S. H., ADESSE. D., STIPURSKY. J. *Toxoplasma gondii* infection impairs radial glia differentiation and its potential to modulate brain microvascular

endothelial cell function in the cerebral cortex. **Microvasc Res**, v. 131, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104024>

MAYHEW. T. M. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 40-229, Apr, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.011>

MEGYERI. M., MAKÓ. V., BEINROHR. L., DOLESCHALL. Z., PROHÁSZKA. Z., CERVENAK. L., ZÁVODSZKY. P., GÁL. P. Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. **J Immunol**, v. 5, n. 183, p. 16-3409, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900879>

MENDES. S., TIMÓTEO-FERREIRA. F., ALMEIDA. H., SILVA. E. New Insights into the Process of Placentation and the Role of Oxidative Uterine Microenvironment. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2019; p. 18, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9174521>

MILIAN. B. C. I., SILVA. J. R., MANZAN-MARTIN. C., BARBOSA. F. B., GUIRELLI. M. P., RIBEIRO. M., GOMES. O. A., IETTA. F., MINEO. R. J., FRANCO. S. P., FERRO. V. A. E. Increased *Toxoplasma gondii* Intracellular proliferation in human extravillous trophoblast cells (HTR8/SVneo line) is sequentially triggered by MIF, ERK1/2, and COX-2. **Front Microbiol**, v. 24, p. 10-852, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00852>

MILLER. L., HUNT. J. S. Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone. **J Immunol**, United States, v. 160, n.10, p.5098-5104, May, 2009.

MIRANDA. J., MARTÍN-TAPIA. D., VALDESPINO-VÁZQUEZ. Y., ALARCÓN. L., ESPEJEL-NUÑEZ. A., GUZMÁN-HUERTA. M., MUÑOZ-MEDINA. E. J., SHIBAYAMA. M., CHÁVEZ-MUNGUÍA. B., ESTRADA-GUTIÉRREZ. G., LIEVANO. S., LUDERT. E. J., GONZÁLEZ-MARISCAL. L. Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1174, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8101174>

- MOORE. K., SULLIVAN. M. H., ELDER. M. G., MOSCOSO. G., TAYLOR. K. M.
Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. **Proc Natl Acad Sci**, v. 2, n. 90, p. 91-687, 1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.687>
- MONTOYA. J. G., LIESENFELD. O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 76-1965, June, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- MOSER. G., WINDSPERGER. K., POLLHEIMER. J., CHUVA. S. L. S., BERTHOLD. H.
Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. **Histochem Cell Biol.**, v. 150, n. 4, p. 361-370, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1699-0>
- 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. N. C., 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, p. 407-410, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.407-410.2000>
- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 147 - 56, 2003.
- NG. C. T., FONG. Y. L., YONG. K. Y., HAKIN. N. M., AHMAD. Z. Interferon- γ induces biphasic changes in caldesmon localization as well as adherens junction organization and expression in HUVECs. **Cytokine**, v. 111, p. 541-550, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.06.010>
- NORWITZ. E. R. Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. **Reprod Biomed Online**, v. 14, n. 1, p. 101-109, 2007.

OLIVEIRA. G. J., SILVA. M. N., SANTOS. A. A., SOUZA. A. M., FERREIRA. L. G., MINEO. R. J., FERRO. A. E. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN gamma. **Placenta**, v. 27, p. 691-698, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.06.006>

OPSTEEGH. M. M., KORTBEEK. T. L., HAVELAAR. A. A., VAN DER GIESSEN. J. J. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clin Infect Dis**, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416041-5.00023-8>

ORTIZ-ALEGRÍA. L. B., CABALLERO-ORTEGA. H., CAÑEDO-SOLARES. I., RICO-TORRES. C. P., SAHAGÚN-RUIZ. A. MEDINA-ESCUZIA M. E., CORREA. D. Congenital toxoplasmosis: the role of host and parasite genetics on transmission and pathogenesis. **Genes Immun**, n. 11, p. 37-363, 2010. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>

OSHIMA. T., LAROUX. S. F., COE. Z., MORISE. S., KAWACHI. P., BAUER. M. B., GRISHAM. R. D., SPECIAN. P., CARTER. S., JENNINGS. D. N., GRANGER. T., JOH. J. S. Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. **Microvasc. Res**, v. 61, p. 130-143, 2001. <https://doi.org/10.1006/mvre.2000.2288>

PASTRE. J. M., CASAGRAND. L., GOIS. M. B., PEREIRA-SEVERI. L. S., MIQUELOTO. C. A., GARCIA. J. L., ALCÂNTARA NOGUEIRA-MELO. G., SANTANA. M. D. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. **Biomed Pharmacother**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108797>

PAPPAS. G., ROUSSOS. N., FALAGAS. ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol, England**, v. 39, n. 12, p. 94 - 1385, oct, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

PARK. J-H., ZHANG. Y., GEORGESCU. P. S., JOHNSON. L. K., KONG. D., GALPER.B.

J. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. **Stem Cell Rev**, v. 2, n. 2, p. 93-102, 2006. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0015-x>

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

PIJNENBORG. R., AANTHONY. J., DAVEY. D. A., REES. A., TILTMAN. A., VERCRUYSSSE. L., VAN. A. A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 98, p. 648-655, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1991.tb13450.x>

PIJNENBORG. R., BALL. E., BULMER. J. N., HANSENS. M., ROBSON. S. C., VERCRUYSES. L. In vivo analysis of trophoblast cell invasion in the human. **Methods Mol Med**, n. 122, p. 11-44, 2006. <https://doi.org/10.1385/1-59259-989-3:9>

POLACHEK. H., HOLCBERG. G., POLACHEK. J., RUBIN. M., FEINSHTEIN. V., SHEINER.E., BEN-ZVI. Z. Carrier-mediated uptake of Levofloxacin by BeWo cells, a human trophoblast cell line. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 281, n. 5, p. 8-833, May, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00404-009-1177-y>

PFAFF. W. A., GEORGES. S., ABOU-BACAR. A., LETSCHER-BRU. V., KLEIN. J-P., MOUSLIN. M., CANDOLFI. E. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. **Immunol Cell Biol**, v. 83, n. 5, p. 9-483, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01356.x>

PRATT. A., COSTA. S. F., BORG. J. A., KALIONIS. B., KEOGH. R., MURTHI. P. Placenta-derived angiogenic proteins and their contribution to the pathogenesis of preeclampsia. **Angiogenesis**, v. 18, n. 2, p. 115-123, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9452-3>

RANGO. U. V. Fetal tolerance in human pregnancy – A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters**, v. 115, n. 1, p. 21 – 32, Jan, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.09.014>

REDMAN. C. W., SARGENT. I. L. Immunology of pre-eclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 534-543, Jun, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x>

REZENDE-OLIBEIRA. K., SILVA. N. M., MINEO. J. R., RODRIGUES. J. V. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. **Placenta**, v. 9, n. 33, p. 7 – 682, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.013>

ROBERTS. C. W., WALKER. W., ALEXANDER. J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 476 - 488, Jul, 2001. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.476-488.2001>

ROBERTSON. P. W., KERTSZ. V. Modified fluorescent antibody technique to detect immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* in congenital infection. **J Clin Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 2-161, 1975. <https://doi.org/10.1128/jcm.2.5.461-462.1975>

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

ROBERT-GANGNEUX. F., DARDÉ. M. L. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 96-264, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROSS. C. E., OLIVEIRA. G. C., BARRAGAN. A. Dysregulation of focal adhesion kinase upon *Toxoplasma gondii* infection facilitates parasite translocation across polarised primary brain

endothelial cell monolayers. **Cell Microbiol**, v. 21, p. 13048, 2019.
<https://doi.org/10.1111/cmi.13048>

ROYALL. A. J., BERKOW. R. L., BECKMAN. J. S., CUNNINGHAM. M. K., MATALON. S., FREEMAN. B. A. Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability. **Am. J. Physiol**, v. 257, p. 399-410, 1989.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.1989.257.6.L399>

RYAN. S. U. Structural basis for endothelial cell function: Role of calcium, polyphosphoinositide turnover and G-proteins. **Vascular Endothelium**, 1984. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8532-5_1

SABIN. A. B and OLITSKY. P. K. Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. **Science**, v. 8, p. 3-36, 1937. <https://doi.org/10.1126/science.85.2205.336>

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>

SALAMONE. G., FRACCAROLI. L., GORI. S., GRASSO. E., PAPANINI. D., GEFFNER. J., PÉREZ LEIRÓS. C., RAMHORST. R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Human Reproduction**, v. 27, n. 9, p. 606-2598, Set, 2012.
<https://doi.org/10.1093/humrep/des208>

SALKER. M. S., CHRISTIAN. M., STEEL. J. H., NAUTIYAL. J., LAVERY. S., TREW. G., WEBSTER. Z., AL-SABBAGH. M., PUCHCHAKAYALA. G., FÖLLER. M., LANDLES. C., SHARKEY. A. M., QUENBY. S., APLIN. J. D., REGAN. L., LANG. F., BROSENS. J. J. Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. **Nat Med**, v. 11, n. 17, p. 13-1509, 2011.
<https://doi.org/10.1038/nm.2498>

SCHEGLOVITOVA. N. O., ROMANOV. Y. A., MAKSIANINA. E. V., SVINTSITSKAYA. V. A., PRONIN. A. G. Herpes simplex type I virus infected human vascular endothelial cells induce the production of anti-viral and pro-inflammatory factors by peripheral blood leukocytes *in vitro*. **Russ J Immunol**, v. 7, p. 22-115, 2002.

SCHLUTER. D., DAUBENER. W., SCHARES. G., GROSS. U., PLEYER. U., LUDER. C. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int J Med Microbiol**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>

SEPULVEDA-ARIAS. J. C., VELOZA. L. A., MANTILLA-MURIEL. L. E. Anti-Toxoplasma activity of natural products: a review. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 3, n. 9, p. 94-186, 2014. <https://doi.org/10.2174/1574891X10666150410120321>

SHAHGASEMPOUR. S. WOODROFFE. S. B., GARNETT. H. M. Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after *in vitro* infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus. **Microbiol Immunol**, v. 41, p. 9-121, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01177.x>

SIBLEY. L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 72–91, Mar., 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x>

SILVA. M. N., GAZZINELLI. T. R., SILVA. A. D., FERRO. A. E., KASPER. H. L., MINEO. R. J. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during *in vivo* conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infect Immun**, v. 66, p. 63-3959, 1998. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3959-3963.1998>

SILVA. R. C., LANGONI. H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res**, v. 105, n. 4, p. 893-898, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1526-6>

SIVASUBRAMANIAM. T., GARCIA. J., TAGLIAFERRO. A., MELLAND-SMITH. M.,

CHAUVIN. S., POST. M., TODROS. T., CANIGGIA. I. Where polarity meets fusion: role of Par6 in trophoblast differentiation during placental development and preeclampsia. **Endocrinology**, v.154, n. 3, p. 1296-1309, 2013. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1823>

SOLDATI. D., MEISSNER. M. Toxoplasma as a novel system for motility. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, p. 4 - 32, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.013>

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. Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **J Biol Chem**, v. 18, p. 12733 - 12741, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.419911>

SONAR. A. S., SHAIKH. S., JOSHI. N., ATRE. N. A., LAL. G. IFN γ promotes transendothelial migration of CD4⁺ T cells across the blood-brain barrier. **Immunol Cell Biol**, v. 95, n. 9, p. 843-853, 2017. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.56>

SONG. B. H., JUN. O. H., KIM. H. J., LEE. H. Y., CHOI. H. M., KIM. H. J. Disruption of outer blood-retinal barrier by *Toxoplasma gondii*-infected monocytes is mediated by paracrinely activated FAK signaling. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175159>

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

SOUZA. F., CARDOSO. S. Incidência de Toxoplasmose no Brasil, v..6, n.1, 2011.

SCHWANER. E., NÉMETH. Z., JANI. P. K., KAJDÁCSI. E., DEBRECZENI. M. L.,

- DOLESCHALL. Z., DOBÓ. J., GÁL. P., RIGÓ. J., ANDRÁS. K., HEGEDÚS. T., CCERVENAK. L. Transcriptome analysis of inflammation-related gene expression in endothelial cells activated by complement MASP-1. **Sci Rep**, v. 1, n. 7, p. 10462, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09058-8>
- SHARMA. S., GODBOLE. G., MODI. D. Decidual control of trophoblast invasion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 3, p. 341–350, Mar, 2016. <https://doi.org/10.1111/aji.12466>
- SMITH. J. R., FRANC. D. T., CARTER. N. S., ZAMORA. D., PLANCK. S. R., ROSENBAUM. J. T. Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Invest Ophthalmol**, n. 45, p.1157– 116, 2004. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1105>
- SMITH. S. D., DUNK. C. E., APLIN. J. D. HARRIS. L. K., JONES. R. L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. **Am J Pathol**, n. 174, p. 1959-1971, 2009. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080995>
- STAFF. A. C., DECHEND. R., PIJNENBORG. R. Learning from the placenta: Acute atherosclerosis and vascular remodeling in preeclampsia-novel aspects for atherosclerosis and future cardiovascular health. **Hypertension**, v. 6, n. 56, p. 34-1026, 2010. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.157743>
- STEVENSON. B. R., SILICIANO. J. D., MOOSEKER. M. S., GOODENOUGH. D. A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. **J Cell Biol**, v. 103, n. 3, p. 755–766, 1986. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.755>
- STOLPEN. A. H., GUINAN. C. E., FIERS. W., POBER. S. J. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. **Am J. Pathol**, v. 123, p. 16-24, 1986.

SYKES. L., MACINTYRE. D. A., YAP. X. J., TEOH. T. G., BENNETT. P. R. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators of Inflammation**, p. 967629, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/967629>

TAKAO. T., ASANOMA. K., KATO. K., FUKUSHIMA. K., TSUNEMATSU. R., HORAKAWA. T., MATSUMURA. S., TAKEDA. S., MAKE. N. Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and HTR8/SVneo cell line. **PlosOne**, v. 6, p. 1-11, 1990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021990>

TESSIER. D. R., YOCKELL-LELIÈVRE. J., GRUSLIN. A. Uterine spiral artery remodeling: The role of uterine natural killer cells and extravillous trophoblasts in normal and high-risk human pregnancies. **Am J Reprod Immunol**, v. 1, n. 74, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1111/aji.12345>

TOO. L. K., BALL. J. H., MCGREGOR. S. I., HUNT. H. N. The pro-inflammatory cytokine interferon-gamma is an important drive of neuropathology and behavioural sequelae in experimental pneumococcal meningitis. **Brain Behav Immunol**, v. 40, p. 252-267, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.02.020>

TOOTHAKER. M. J., PRESICCE. P., CAPPELLETTI. M., STRAS. F. S., COLLIN. M. C., CHOUGNET. A. C., KALLAPUR. G. S., KONNIKOVA. L. Immune Cells in the Placental Villi Contribute to Intra-amniotic Inflammation. **Front Immunol**, v. 11, n. 866, p. 1-18, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00866>

TORNAVACA. O., CHIA. M., DUFTON. N., ALMADRO. O. L., CONWAY. E. D., RANDI. M. A., SCHWARTZ. A. M., MATTER. K., BALDA. S. M. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. **J Cell Biol**. v. 208, n. 6, p. 38-821, 2015. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404140>

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

VAN-EIJK. T. L., NOOTEBOOM. A., HENDRIKS. T., SPRONG. T., NETEA. M. G., SMITS. P., VAN DER HOEVEN. J. G., PICKKERS. P. Plasma obtained during human endotoxemia increases endothelial albumin permeability in vitro. **Shock**, v. 25, p. 62-358, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000209527.35743.b0>

VAN DE STOLPE. A and VAN DER SAAG. P. T. Intercellular adhesion molecule-1. **J Mol Med**, n. 74, p. 13-33, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00202069>

VANE. J. Endothelins come home to roost. **Nature**, v. 6303, n. 348, p. 673, 1990. <https://doi.org/10.1038/348673a0>

VAZ. S. R., RAULIP. P., MELLO. G. R., CARDOSO. A. M. Congenital Toxoplasmosis: A Neglected Disease? – Current Brazilian public health policy. **Field Actions Science Reports**, v. 3, p. 9, 2011.

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

VELÁSQUEZ. D. Z., CONEJEROS. I., LARRAZABAL. C., KERNER. K., HERMOSILLA. C., TAUBERT. A. *Toxoplasma gondii*-induced host cellular cell cycle dysregulation is linked to chromosome missegregation and cytokinesis failure in primary endothelial host cells. **Scientific Reports**, p.12496, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48961-0>

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>

VILLE. Y., LERUEZ-VILLE. M. Managing infections in pregnancy. **Curr Opin Infect Dis**, v. 3, n. 27, p. 7–251, 2014. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000066>

WANG. M. F., LU. Y. C., LAI. C. S. Up regulation of Matrix Metalloproteinases -2 and -9 via an ERK1/2/ NF- κ B pathway in Murine mast cells infected with *Toxoplasma gondii*. **Infections Disease**, v. 149, p. 146 - 155, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.03.002>

WEISS. L. M., DUBEY. J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895-901, Jul, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>

WEISS. G., SUNDL. M., GLASNER. A., HUPPERTZ. B., MOSER. G. O plug trofoblasto durante o início da gravidez: uma visão mais profunda. **Histochem Cell Biol.**, v. 146, n. 6, p. 749-756, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1474-z>

WINSHIP. A., CUMAN. C., RAINCZUK. K., DIMITRIADIS. E. Fibulin-5 is upregulated in decidualized human endometrial stromal cell and promotes primary human extravillous trophoblast outgrowth. **Placenta**, v. 36, p.1405-1411, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.10.008>

WHITLEY. G. S., CARTWRIGHT. J. E. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. **Placenta**, v. 31, p. 74-465, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.03.002>

WOODMAN. J. P., DIMIER. I. H., BOUT. D. T. Human endothelial cells are activated by IFN-gamma to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Inhibition is due to a different mechanism from that existing in mouse macrophages and human fibroblasts. **J Immunol**, n. 147, p. 2019-2013, 1991.

WOTH. K., PREIN. C., STEINHORST. K., DIEHL. S., BOEHNCKE. W. H., BUERGER. C.
Endothelial cells are highly heterogeneous at the level of cytokine-induced insulin resistance.
Exp Dermatol, v. 22, p. 8-714, 2013. <https://doi.org/10.1111/exd.12235>

ZAMORA. D. O., ROSENBAUM. J. T., SMITH. J. R. Invasion of human retinal vascular endothelial cells by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Br J Ophthalmol**, v. 6, n. 92, p. 5-852, 2008. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.133314>

ZEMENE. E., YEWHALAW. D., ABERA. S., BELAY. T., SAMUEL. A., ZEYNUDIN. A.
Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors among pregnant women in Jimma town, Southwestern Ethiopia. **BMC Infect Dis**, p. 12-337, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-337>

ANEXOS

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –
Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;
e-mail: cep@propp.ufu.br ; www.comissoes.propp.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

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

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

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A interação entre vilos placentários e células endoteliais da veia umbilical pode ser modulada pela infecção por *Toxoplasma gondii*

Pesquisador: Eloisa Amália Vieira Ferro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 91649118.6.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.136.586

Apresentação do Projeto:

Trata-se de atendimento a pendências apontadas no parecer CONEP nº 2.880.822 de 08 de setembro de 2018.

Metodologia

Placentas humanas serão adquiridas de pacientes gestantes (terceiro trimestre de gestação) após o parto cesariano no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU). A placenta será dissecada e os vilos flutuantes serão coletados e colocados em placas de 6 poços. Após 24 horas os vilos serão infectados ou não por *T. gondii* (cepa RH 2F1). Os sobrenadantes serão coletados para posterior tratamento das células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) que estarão infectadas ou não. Nas células HUVEC serão avaliados: parasitismo através da reação de betagalactosidase; citocinas pró

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239.4131

Fax: (34)3239.4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

-inflamatórias (IL-6,TNF-a,IL-8, MIF, IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10,TGF-b,IL-4) através da reação ELISA (Ensaio imunoenzimático);moléculas de adesão como ICAM e VCAM através da reação de Western blotting e apoptose celular por citometria de fluxo.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão coletadas as placentas de pacientes parturientes entre 18 a 45 anos de idades,

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239.4131 **Fax:** (34)3239.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

sorologicamente saudáveis (negativas para Toxoplasmose e outras infecções), que não apresentem pré-eclampsia, hipertensão coriônica, doenças cardíacas, diabetes e outras manifestações clínicas que possam interferir nos resultados.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídas do projeto placenta de pacientes parturientes e sorologicamente positivas para *Toxoplasma gondii* e outras infecções. Além de pacientes diabéticas, hipertensas e com pré-eclampsia. Não serão coletadas placentas de pacientes parturientes menos de 18 e acima de 45 anos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a influência das moléculas liberadas por vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional, infectados ou não por *T. gondii*, em células HUVEC.

Objetivos específicos

- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em vilos placentários, infectados ou não por *T. gondii*;
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células HUVEC infectadas ou não e tratadas com sobrenadante de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a produção de nitrito em vilos placentários, infectados ou não por *T. gondii*;
- Avaliar a produção de nitrito em células HUVEC infectadas ou não e tratadas com sobrenadante de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a expressão de moléculas de adesão ICAM em células HUVEC infectadas ou não e tratadas com sobrenadante de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HUVEC infectadas ou não e tratadas com sobrenadante de vilos placentários infectados ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a apoptose das células HUVEC infectadas ou não e tratadas com sobrenadante de vilos

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3230.4131

Fax: (34)3230.4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

placentários infectados ou não com *T. gondii*.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239.4131 **Fax:** (34)3239.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

"A utilização de placentas humanas a termo neste estudo não oferece risco à saúde da paciente, médicos, enfermeiros e ao pesquisador que irá manuseá-las, uma vez que a placenta humana será normalmente expulsa pelo organismo materno após o parto. Toda a equipe hospitalar que realizará o parto da gestante faz uso de técnicas de biossegurança, e também o pesquisador que irá manipular a placenta no laboratório fará uso de equipamentos e vestimentas de segurança, como jaleco, luvas, máscara, óculos e fluxo laminar. Portanto, nenhum risco à saúde haverá para os participantes do projeto, equipe hospitalar e a paciente. No entanto, sempre há um risco mínimo de identificação dos sujeitos da pesquisa, ou seja, as pacientes parturientes. Este risco mínimo de identificação pessoal será claramente descrito no TCLE, embora a identidade das pacientes será preservada. A equipe executora se compromete com o sigilo absoluto da sua identidade, pois os dados publicados só serão referentes à biologia e ao processo de invasão de *T. gondii* nos vilos placentários.

Os benefícios da presente proposta são significantes tanto para a ciência quanto para as gestantes, pois os resultados obtidos poderão proporcionar o estabelecimento de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento da toxoplasmose congênita, reduzindo as taxas de transmissão vertical do parasito e, conseqüentemente, as taxas de aborto. O estabelecimento de drogas alternativas para o tratamento da toxoplasmose congênita auxiliará as gestantes positivas para *T. gondii*, aumentando o leque de opções de tratamento."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores indicaram anteriormente na Plataforma Brasil que seu projeto se enquadrava na Área Temática Especial "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;" e, por razão disso, o projeto foi

analisado pela instância superior que é a CONEP. Entretanto, segundo parecer emitido pela CONEP, o protocolo não se enquadra na área de apreciação da Comissão, conforme preconizado no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012. A comissão encaminhou algumas inadequação



Continuação do Parecer: 3.136.586

(ões) para correção antes do início da pesquisa e solicitou ao CEP/UFU verificar o cumprimento das inadequações do protocolo pelo (a) pesquisador (a).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou documento com os esclarecimentos e atendimento das pendências apontadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências apontadas no parecer CONEP nº 2.880.822 de 08 de setembro de 2018:

PENDÊNCIA CONEP: 1) Solicita-se retirar a indicação de que se trata de pesquisa da área temática "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte" no cadastro do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, uma vez que esse estudo não se enquadra nas áreas temáticas descritas para apreciação da CONEP (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IX.4) e Carta Circular nº 172/2017/CONEP/CNS/MS.

RESPOSTA PESQUISADOR: Retirou-se a indicação de que se trata de pesquisa da área temática.

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

PENDÊNCIA CONEP: Solicita-se que a metodologia do protocolo seja apresentada de forma clara, detalhada e ordenada, em especial os métodos que afetam os participantes da pesquisa. Cumpre ressaltar que, conforme previsto na Resolução CNS nº 466 de 2012, item III.2.e, a pesquisa envolvendo seres humanos deverá utilizar métodos adequados para responder às questões estudadas, especificando-os, seja em pesquisas quantitativas, qualitativas ou quali-quantitativas.

RESPOSTA PESQUISADOR: As alterações foram realizadas no projeto no item 4.1 destacado em amarelo.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3230.4131 **Fax:** (34)3230.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239.4131 **Fax:** (34)3239.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

PENDÊNCIA CONEP: O TCLE não apresenta a numeração nas páginas. Com o objetivo de garantir a integridade do documento, solicita-se que sejam inseridos os números de cada página, bem como a quantidade total delas, como por exemplo: "1 de X" e assim sucessivamente até a página "X de X".

RESPOSTA PESQUISADOR: As numerações foram adicionadas no arquivo adicionado TCLE.

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

PENDÊNCIA CONEP: Solicita-se que conste no TCLE que todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável/pessoa por ele delegada e pelo participante/responsável legal (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA PESQUISADOR: A solicitação foi adicionada no documento TCLE anexado e destacado em amarelo

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

PENDÊNCIA CONEP: Solicita-se que conste neste documento informação de que o TCLE é elaborado em duas VIAS, que deverão ser assinadas ao final pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s). Salienta-se que os campos de assinatura de ambos deverão estar na mesma página (folha) (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA PESQUISADOR: A solicitação foi adicionada no documento TCLE anexado e destacado em amarelo.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3230.4131 **Fax:** (34)3230.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

PENDÊNCIA CONEP: Solicita-se que conste em ambas as vias do TCLE os contatos telefônicos dos

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239.4131 **Fax:** (34)3239.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

responsáveis pela pesquisa, bem como o horário em que o participante poderá entrar em contato. Além disso, deve ser informado o contato telefônico em caso de emergência, disponível 24 horas (Item IV.5.d da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA PESQUISADOR: A solicitação foi adicionada no documento TCLE anexado e destacado em amarelo.

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

PENDÊNCIA CONEP: É necessário descrever no TCLE todos os procedimentos envolvidos na pesquisa, incluindo quais análises serão realizadas e suas respectivas finalidades, em linguagem clara e acessível à compreensão leiga. Sendo assim, solicita-se descrever quais biomarcadores serão pesquisados nas amostras biológicas coletadas dos participantes, bem como o objetivo de cada análise (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a).

RESPOSTA PESQUISADOR: Foi descrito no TCLE anexado todos os procedimentos envolvidos e destacados na cor amarela.

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida.

PENDÊNCIA CONEP: Conforme indicado no protocolo, haverá constituição de Banco de Materiais Biológicos com vistas a utilização futura. Portanto, solicita-se esclarecer se tal Banco corresponde a um Biobanco ou a um Biorrepositório, conforme definições estabelecidas na Resolução CNS nº 441 de 2011, que contém as diretrizes vigentes a respeito do armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa. A depender da categorização do Banco, solicita-se a apresentação dos documentos necessários para cumprimento das disposições contidas na Resolução CNS nº 441 de 2011 e na Portaria MS

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239.4131

Fax: (34)3239.4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

nº 2201 de 2011. Tais documentos estão apresentados e resumidos nas páginas 48 e 49 do “Manual de Orientação: Pendências Frequentes em Protocolos de Pesquisa Clínica” (disponível em: http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/documentos/MANUAL_ORIENTACAO_PENDENCIAS_FREQUENTES)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239.4131 **Fax:** (34)3239.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

_PROTOCOLOS_PESQUISA_CLINICA_V1.pdf).

RESPOSTA PESQUISADOR: O material coletado será colhido apenas para a realização de experimentos em cultura com duração de 48 horas. Para a avaliação de citocinas, quimiocinas, expressão de proteínas. E após o tempo de 48 horas esse material será descartado.

PARECER CEP/UFU: Pendência atendida. O CEP/UFU considerou sendo um Biorepositório.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: abril de 2020.

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

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo Participante da pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3230.4131 **Fax:** (34)3230.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

- O Participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239.4131 **Fax:** (34)3239.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante da pesquisa ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_996751.pdf	18/01/2019 09:16:50		Aceito
Outros	Conductas.docx	18/01/2019 09:16:03	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	18/01/2019 09:15:54	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/01/2019 09:30:38	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Outros	Respostas_as_pendencias.docx	02/08/2018 14:11:34	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Modelo_Termo_de_Compromisso_Equipe_Executora.doc	14/06/2018 11:37:53	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Intrumento_de_Coleta.pdf	11/06/2018 11:18:38	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Modelo_Termo_de_Compromisso_Equipe_Executora_Lattes.pdf	22/05/2018 13:52:57	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_da_Equipe.pdf	22/05/2018 13:52:27	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3230.4131

Fax: (34)3230.4335

E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 3.136.586

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	22/05/2018 13:51:13	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HC.pdf	24/04/2018 14:22:41	Eloisa Amália Vieira Ferro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 07 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

**Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3230.4131 **Fax:** (34)3230.4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br