

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

SINALIZAÇÃO CELULAR NOTCH NA INFECÇÃO DO TROFOBlasto
EXTRAVIDUOSO HUMANO POR *Toxoplasma gondii*

Marcos Paulo Oliveira Almeida

Uberlândia
Outubro – 2023

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

SINALIZAÇÃO CELULAR NOTCH NA INFECÇÃO DO TROFOBlasto
EXTRAIVILOSO HUMANO 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
Doutor

Discente: Marcos Paulo Oliveira Almeida.

Orientador(a): Neide Maria da Silva.

Uberlândia
Outubro – 2023

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

A447 2023	Almeida, Marcos Paulo Oliveira, 1994- SINALIZAÇÃO CELULAR NOTCH NA INFECÇÃO DO TROFOBLASTO EXTRAVALOSO HUMANO POR <i>Toxoplasma gondii</i> [recurso eletrônico] / Marcos Paulo Oliveira Almeida. - 2023. Orientadora: Neide Maria da Silva. 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.2023.558 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Imunologia. I. Silva, Neide Maria da, 1961-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título. CDU: 612.017
--------------	--

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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 155				
Data:	vinte e seis de outubro de dois mil e vinte três	Hora de início:	07h45	Hora de encerramento:	12h20
Matrícula do Discente:	11913IPA001				
Nome do Discente:	Marcos Paulo Oliveira Almeida				
Título do Trabalho:	Sinalização celular notch na infecção do trofoblasto extraviloso humano por <i>Toxoplasma gondii</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alterações imunopatológicas em infecções por protozoários, com ênfase em <i>toxoplasma gondii</i> , bactérias e helmintos				

No dia 26 de outubro de 2023, reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelo(a) Presidente(a): Neide Maria da Silva - UFU, e os titulares: Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua - USP; Emerson Soares Bernardes - IPEN; Bellisa de Freitas Barbosa - UFU; Marcelo Emílio Beletti - UFU.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Neide Maria da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente, 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):

APROVADO

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 **Emerson Soares Bernardes, Usuário Externo**, em 26/10/2023, às 15:51, 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 **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/10/2023, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/10/2023, às 17:07, 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 **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/10/2023, às 18:46, 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 **Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, Usuário Externo**, em 26/10/2023, às 18:55, 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 **4925570** e o código CRC **BCC5BAA1**.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Neide Maria da Silva por me orientar há mais de 10 anos, por ser para mim um exemplo de ética, honestidade, competência, inteligência e perseverança, pelos valiosos ensinamentos pessoais e profissionais passados a mim, por me alertar com seriedade sempre que necessário, pelas ideias compartilhadas e sugeridas, pela confiança em mim depositada quanto às minhas propostas e em muitos aspectos da rotina de trabalho, pelas oportunidades a mim concedidas, como de contribuir com seu laboratório e com as pesquisas nele desenvolvidas, e por sempre desejar e buscar, dentro do possível, o melhor para mim. Obrigado por tudo.

Às colaboradoras Eloisa Amália Vieira Ferro e Bellisa de Freitas Barbosa pela confiança em mim depositada, pelos reagentes, materiais e espaço de trabalho concedidos, pelas ideias propostas para nossos trabalhos e por, junto à Neide, sempre desejarem e buscarem, dentro do possível, o melhor para mim. Obrigado por tudo.

Aos colaboradores Emerson Soares Bernardes e Sofia Nascimento dos Santos pelos reagentes e materiais concedidos, bem como pelas ideias e direcionamentos propostos, para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por tudo.

À Yusmaris Cariaco, Guilherme de Souza, Samuel Teixeira, Kelvin Espinoza e Iasmin Cunha pela amizade verdadeira, por serem confidentes e ombro amigo nos momentos difíceis, pela confiança que sempre depositaram em mim em lhes ouvir ou em lhes ajudar na rotina de trabalho, por sempre acreditarem em mim e por sempre buscarem e desejarem, dentro do possível, o melhor para mim. Obrigado por tudo.

À minha orientadora professora Neide, às professoras Eloisa e Bellisa, ao professor Marcelo Emílio Beletti, às professoras Angelica de Oliveira Gomes e Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, bem como outros professores presentes em minha trajetória, por serem exemplos e referências profissionais para mim. Obrigado a todos.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelos apoios financeiros que permitiram a execução deste estudo, e à CAPES pelo financiamento integral de minha bolsa de doutorado.

RESUMO

A toxoplasmose congênita decorre da aquisição materno-fetal de *Toxoplasma gondii* e é caracterizada por complicações fisiopatológicas que afetam o curso gestacional. Durante a infecção materna, *T. gondii* coloniza o microambiente placentário, infectando o trofoblasto extraviloso através do qual o parasito pode atingir os compartimentos fetais. Células trofoblásticas extravilosas humanas contribuem para o sucesso gestacional por atuarem em adaptações fisiológicas maternas para a placentação adequada e aceitação do conceito em desenvolvimento, sendo suas atividades reguladas por mecanismos de transdução de sinais em que se destaca a via de sinalização celular Notch, cuja ação controla eventos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose. A contribuição da sinalização Notch na toxoplasmose aguda experimental foi previamente investigada através da inibição do complexo enzimático gama-secretase, essencial a sua ativação. Uma vez que a influência da sinalização Notch na infecção do trofoblasto extraviloso humano por *T. gondii* se mostra inexplorada, este cenário foi objeto de investigação no presente estudo. Para isso, células HTR-8/SVneo, enquanto modelo de trofoblasto extraviloso humano, foram infectadas por *T. gondii*, ou não, tratadas com inibidores químicos de gama-secretase, ou não, e avaliadas quanto a expressão gênica, parasitismo, produção de citocinas, ativação do receptor Notch1 e mecanismos adicionais. Em resposta à infecção, células HTR-8/SVneo apresentaram reduções na expressão gênica de *DLL4*, *APP* e *IL6R*, bem como nas ativações de ambos, o receptor Notch1 e o fator de sinalização STAT3. No entanto, os tratamentos com os inibidores de gama-secretase, DBZ, DAPT e GSI-XIV, promoveram reduções do parasitismo celular, bem como elevaram ou reduziram as secreções das citocinas IL-6, IL-8 e MIF. Embora MIF e IL-6 tenham tido produções aumentadas pelas células em resposta à infecção, estas citocinas parecem não estar envolvidas no controle do parasitismo desencadeado pelos inibidores de gama-secretase. Coletivamente, evidencia-se que gama-secretase é essencial à proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo, as quais respondem à infecção reduzindo a ativação de Notch1, sugerindo o envolvimento da via de sinalização Notch na infecção do trofoblasto extraviloso humano por *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; trofoblasto extraviloso; sinalização Notch.

ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis results from the maternal-fetal acquisition of *Toxoplasma gondii* and is characterized by physiopathological complications that affect the course of pregnancy. During maternal infection, *T. gondii* colonizes the placental microenvironment, infecting the extravillous trophoblast through which the parasite can reach the fetal compartments. Extravillous trophoblast cells contribute to gestational success by acting in maternal physiological adaptations for adequate placentation and acceptance of the developing conceptus, being their activities regulated by signal transduction mechanisms in which the Notch signaling pathway stands out, whose action controls cellular events such as proliferation, differentiation, and apoptosis. The contribution of Notch signaling in experimental acute toxoplasmosis was previously investigated through the inhibition of the gamma-secretase enzyme complex, essential for its activation. Since the influence of Notch signaling on the infection of human extravillous trophoblasts by *T. gondii* remains unexplored, this scenario was the subject of investigation in the present study. For this, HTR-8/SVneo cells, as a model of human extravillous trophoblast, were infected with *T. gondii*, or not, treated with chemical inhibitors of gamma-secretase, or not, and evaluated for gene expression, parasitism, cytokine production, Notch1 receptor activation and additional mechanisms. In response to infection, HTR-8/SVneo cells showed reductions in the gene expression of *DLL4*, *APP*, and *IL6R*, as well as in the activation of both, the Notch1 receptor and the STAT3 signaling factor. However, treatments with the gamma-secretase inhibitors, DBZ, DAPT and GSI-XIV, promoted reductions in cellular parasitism, as well as increased or decreased the secretions of the cytokines IL-6, IL-8, and MIF. Although MIF and IL-6 had increased production by cells in response to infection, these cytokines seem not to be involved in the control of parasitism triggered by gamma-secretase inhibitors. Collectively, it is evident that gamma-secretase is essential for the proliferation of *T. gondii* in HTR-8/SVneo cells, which respond to infection by reducing the activation of Notch1, suggesting the involvement of Notch signaling pathway in the infection of human extravillous trophoblast by *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; extravillous trophoblast; Notch signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeito da infecção por <i>T. gondii</i> na expressão gênica celular	27
Figura 2 – Efeitos de DBZ, DAPT e GSI-XIV na viabilidade celular e parasitismo	30
Figura 3 – Ativação do receptor Notch1 em células HTR-8/SVneo	32
Figura 4 – Secreção das citocinas MIF e IL-8 por células HTR-8/SVneo.....	34
Figura 5 – Ativação de STAT3 e sua inibição em células HTR-8/SVneo	36
Figura 6 – Atuação de ligantes de Notch, secreção de IL-6 e expressão de <i>IL6R</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APH1 – *anterior pharynx defective 1*

APP – *amyloid precursor protein*

ANOVA – *analysis of variance*

BCA – *bicinchoninic acid*

Bcl2 – *B-cell lymphoma 2*

BSA – *bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

c-Myc – *cellular myelocytomatosis*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ – dióxido de carbono

Ct – *cycle threshold*

DAPT – *N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester*

DBZ – *dibenzazepine*

DLL – *delta-like ligand*

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

EUA – Estados Unidos da América

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GSI – *Gamma-Secretase Inhibitor*

GSI-XIV – *Gamma-Secretase Inhibitor-XIV*

hCG – *human chorionic gonadotropin*

HCl – ácido clorídrico

HEPES – *N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)*

HES – *Hairy and Enhancer of Split*

HEY – *Hairy/E(spl)-related with YRPW motif*

HLA – *human leukocyte antigen*

IFN-γ – *interferon-gamma*

IL – *interleukin*

IL6R – *interleukin-6 receptor*

JAG – *jagged*

kDa – *kilodaltons*

MAML – *mastermind-like*

MIF – *macrophage migration inhibitory factor*

MMP – *matrix metalloproteinase*

mRNA – *messenger ribonucleic acid*

MTT - *methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*

NaCl – cloreto de sódio

NaF – fluoreto de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

Na₃VO₄ – ortovanadato de sódio

NICD – *notch intracellular domain*

p21 – *21 kDa protein*

PEN2 – *presenilin enhancer 2*

p/v – peso/volume

PVDF – *polyvinylidene fluoride*

qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*

RIPA – *radioimmunoprecipitation assay*

RNA – *ribonucleic acid*

rpm – rotações por minuto

RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute-1640*

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel*

SPP – *signal peptide peptidase*

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

TGF-β – *transforming growth factor-beta*

TNF-α – *tumor necrosis fator-alpha*

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

U-M – *University of Michigan*

USP – Universidade de São Paulo

V¹⁷⁵⁴ – resíduo de aminoácido valina na posição 1754

v/v – volume/volume

Y⁷⁰⁵ – resíduo de aminoácido tirosina na posição 705

ZO-1 – *zonula occludens-1*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	JUSTIFICATIVA.....	16
3	OBJETIVOS	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	CULTURA CELULAR.....	18
4.2	INIBIDORES QUÍMICOS E PROTEÍNAS HUMANAS RECOMBINANTES	18
4.3	MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CELULAR	19
4.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	20
4.5	AVALIAÇÃO DO PARASITISMO CELULAR	21
4.6	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA CELULAR.	23
4.7	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SECRETADAS	25
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5	RESULTADOS.....	27
5.1	CÉLULAS HTR-8/SVneo REDUZEM A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM GAMA-SECRETASE FRENTE À INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i>	27
5.2	INIBIDORES DE GAMA-SECRETASE REDUZEM DIFERENCIALMENTE A PROLIFERAÇÃO DE <i>T. gondii</i> EM CÉLULAS HTR-8/SVneo.....	28
5.3	CÉLULAS HTR-8/SVneo APRESENTAM ATIVAÇÃO DE NOTCH1 REDUZIDA FRENTE À INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i> E AOS INIBIDORES DBZ E DAPT	31
5.4	INIBIDORES DE GAMA-SECRETASE MODULAM DIFERENCIALMENTE A SECREÇÃO DE MIF E IL-8 POR CÉLULAS HTR-8/SVneo.....	33
5.5	A ATIVAÇÃO DE STAT3 É MODULADA FRENTE À INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i> E À INIBIÇÃO DE GAMA-SECRETASE	34
5.6	A INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i> , LIGANTES DE NOTCH E DBZ MODULAM A SECREÇÃO DE IL-6 POR CÉLULAS HTR-8/SVneo	36
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO – COMUNICADO CEP/UFU N° 13/2012	56

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar animais de sangue quente, incluindo humanos, e desencadear a toxoplasmose, enfermidade que acomete ao menos um terço da população mundial humana. Durante seu ciclo biológico *T. gondii* se diferencia em formas infectantes típicas denominadas esporozoíto, bradizoíto e taquizoíto. Esporozoítos estão contidos no interior de oocistos, estruturas eliminadas junto às fezes do hospedeiro definitivo felídeo que, quando esporulados, contaminam água e alimentos consumidos pelos hospedeiros intermediários, como a espécie humana. Bradizoítos são característicos de fase crônica da infecção e consistem na forma de multiplicação lenta do parasito, alojando-se em cistos teciduais no hospedeiro intermediário, sendo transmitidos principalmente pelo consumo de carne crua ou malcozida. Por sua vez, taquizoítos são típicos de fase aguda da infecção no hospedeiro intermediário, apresentando intensa proliferação em diferentes tipos de células nucleadas, disseminando-se pelos tecidos e sendo transmitidos especialmente pela via congênita, ao colonizar o microambiente placentário e atingir o concepto em desenvolvimento (Dubey, 1998; Montoya; Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux; Dardé, 2012; Tong *et al.*, 2021).

A infecção por *T. gondii* desencadeia no hospedeiro um padrão de resposta imune celular, com células da imunidade inata e adaptativa operando em conjunto para promover o controle da disseminação do parasito através da produção de mediadores inflamatórios, como citocinas. Citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ e TNF- α , ativam mecanismos microbicidas em diferentes tipos celulares efetores para o controle da proliferação de *T. gondii*, ao passo que citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β , atuam de maneira a modular as funções e a produção de citocinas pró-inflamatórias por células efetoras, atenuando respostas inflamatórias exacerbadas que podem culminar em dano tecidual (Denkers; Gazzinelli, 1998; Miller *et al.*, 2009; Yap; Sher, 1999; Zhu *et al.*, 2019). Já determinadas citocinas, como IL-6 e MIF, apresentam um dualismo frente ao parasitismo, visto que dependendo do contexto e do tipo celular em que atuam, podem ampliar ou minimizar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *T. gondii* (Gomes *et al.*, 2011; Jebbari *et al.*, 1998; Milian *et al.*, 2019; Whitmarsh *et al.*, 2011). Embora a resposta imune atue para controlar a disseminação de *T. gondii*, o parasito possui estratégias para subvertê-la, manipulando, em benefício próprio, eventos celulares essenciais ao

hospedeiro, como a própria resposta imunológica, sobrevivência e morte celular, sendo que, para isso, *T. gondii* interfere em vias de sinalização celular do hospedeiro responsáveis por coordenar tais processos (Denkers *et al.*, 2004; Laliberté; Carruthers, 2008; Zhu *et al.*, 2019). Dentre os elementos alvos de manipulação por *T. gondii*, destaca-se a proteína STAT3, através da qual o parasito é capaz de se evadir da resposta imune protetora contra a infecção (Butcher *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2019).

A infecção por *T. gondii* associada aos efeitos fisiopatológicos decorrentes da resposta imune levam à toxoplasmose, doença infecciosa que, apesar de assintomática em humanos imunocompetentes, agrava-se em imunocomprometidos ou pode afetar a gestação. Neste último cenário, a infecção materna ocorre pelo contato primário com *T. gondii* durante o curso gestacional ou por reativação de fase crônica de uma infecção adquirida previamente à gestação. Sob influência de fatores como o estado imune materno, idade gestacional e características da infecção, uma possível transmissão transplacentária de *T. gondii* pode levar à toxoplasmose congênita, cujas sequelas para o conceito incluem alterações encefálicas, como hidrocefalia, microcefalia e calcificações intracranianas, distúrbios neurológicos, lesões visuais, como retinocoroidite e estrabismo, ou, em casos graves, interrupção da gestação por aborto espontâneo. Os agravantes e as taxas de transmissão congênita variam conforme o curso gestacional, de modo que no primeiro trimestre da gestação as taxas de transmissão são mínimas, porém com efeitos graves para o conceito e para o sucesso da gestação, ao passo que no terceiro trimestre os índices de transmissão são maiores, mas com sequelas menos graves ao feto (Arranz-Solís; Mukhopadhyay; Saeij, 2021; Borges *et al.*, 2019; Heerema-Mckenney, 2018; Kravetz; Federman, 2005; Montoya; Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux; Dardé, 2012).

T. gondii encontra no microambiente placentário um nicho adequado para sua replicação, explorando-o como um veículo de disseminação rumo aos tecidos embrionários/fetais (Heerema-Mckenney, 2018; Megli; Coyne, 2022). Por sua vez, a placenta humana consiste em um órgão transitório para a comunicação materno-fetal, sendo formada e mantida pela constante interação de variados tipos de células maternas uterinas com o trofoblasto, um tipo celular extraembrionário. Funcionalmente, a placenta realiza trocas bioquímicas entre os organismos materno e fetal, bem como coordena adaptações fisiológicas no organismo materno cruciais ao estabelecimento e manutenção da gestação, como regulação endócrina e indução de tolerância imunológica (Gude *et al.*, 2004; Knöfler *et al.*, 2019; Moffett; Loke, 2006).

A formação da placenta humana, cujos eventos compreendem a placentação, é coordenada essencialmente por interações celulares materno-fetais. Durante a implantação embrionária humana, células trofoectodérmicas que revestem externamente o blastocisto passam por sucessivas etapas de diferenciação celular que resultarão no estabelecimento de diferentes populações de células trofoblásticas, com fenótipos e funções específicas. Em um estágio avançado de formação das vilosidades coriônicas, o componente estrutural básico da placenta, as circulações sanguíneas materna e fetal se encontram separadas pela barreira placentária presente nas vilosidades terciárias, cuja estrutura é formada por uma massa celular externa, o sinciciotrofoblasto (ST), em contato íntimo subjacente com uma camada interna de células individualizadas conhecidas por citotrofoblasto viloso (CTV). Por sua vez, a camada de CTV delimita em posição mais interna um eixo central de tecido mesenquimal, povoado por fibroblastos e macrófagos placentários (células de Hofbauer) e que abriga uma ampla rede de capilares sanguíneos fetais. Logo, tendo-se como referencial o espaço intervilloso ocupado por sangue materno que banha as vilosidades, a barreira placentária é formada pela união das camadas epiteliais trofoblásticas de ST e CTV, associadas ao mesênquima e à camada de células endoteliais dos capilares da rede sanguínea fetal (Aplin, 1991; Cindrova-Davies; Sferruzzi-Perri, 2022; Gude *et al.*, 2004; Knöfler *et al.*, 2019; Turco; Moffett, 2019).

As vilosidades coriônicas terciárias, que têm papel fundamental na gestação ao mediar as trocas metabólicas entre o sangue materno e o fetal, desenvolvem-se como estruturas livres no espaço intervilloso preenchido por sangue materno, os chamados vilos flutuantes, ou se conectam diretamente à decídua, constituindo os vilos de ancoragem. A partir da extremidade distal dos vilos de ancoragem, a qual toca e se fixa à decídua, as células de CTV se proliferam acentuadamente no tecido decidual formando uma coluna celular citotrofoblástica (CCC), cujas células passam por etapas de proliferação e diferenciação resultando na formação do citotrofoblasto extraviloso (CTEV), ou simplesmente, trofoblasto extraviloso. Por sua vez, o trofoblasto extraviloso possui capacidades invasiva e migratória especializadas, dispersando-se pela decídua para atuar em importantes adaptações teciduais, que incluem remodelamento vascular, especialmente das artérias espiraladas para a regulação do fluxo sanguíneo local, e o estabelecimento de tolerância imunológica para a aceitação da unidade feto-placentária. Essencialmente, as populações de ST, CTV e CTEV possuem uma linhagem celular progenitora comum, representada pelas células tronco

citotrofoblásticas vilosas. No entanto, de maneira distinta das células de CTV, que ao se diferenciarem estão comprometidas com a via de diferenciação fusogênica (vilosa) para geração e manutenção do ST, as células de CTEV presentes na CCC estão comprometidas com a via de diferenciação invasiva (extravilosa), através da qual o trofoblasto extraviloso se especializa em colonizar o estroma decidual e em adentrar às artérias espiraladas (Bischof; Irminger-Finger, 2005; Gude *et al.*, 2004; Knöfler *et al.*, 2019; Pollheimer *et al.*, 2018; Turco; Moffett, 2019).

A diferenciação do CTEV e sua migração a partir da CCC envolvem eventos celulares que se remontam a uma transição epitélio-mesenquimal. Tais eventos incluem redução na expressão de *epithelial (E)-cadherin* e ZO-1, proteínas típicas de junções celulares de natureza epitelial, modificações na polaridade celular apical-basal e do perfil de expressão de integrinas, incremento no tamanho celular, acúmulo de glicogênio, expressão de marcadores endoteliais como *vascular endothelial (VE)-cadherin*, expressão de MMP2, 3 e 9, e alterações na expressão de receptores para determinados fatores de crescimento. Em paralelo, a diferenciação do CTEV também é marcada por eventos adicionais como redução nas taxas de proliferação celular, dada pela expressão de Ki67, alteração no perfil dos fatores reguladores de ciclo celular, ocorrência de endoreduplicação resultando em células tetraploides e a típica expressão de moléculas não clássicas de HLA de classe I, como o HLA-G, cuja expressão é restrita ao CTEV. Uma vez em contato com a decídua, o CTEV interage com variadas células maternas locais, como células estromais, células *natural killer* uterinas (uNK) e macrófagos deciduais, culminando em uma série de adaptações no microambiente decidual que terão importantes repercussões gestacionais. Dentre estes efeitos, destaca-se a modulação da resposta imune local com a indução de um perfil de tolerância que permitirá a aceitação do organismo fetal e da placenta, bem como o controle das funções desempenhadas pelo próprio CTEV como um *feedback* (Knöfler *et al.*, 2019; Pollheimer *et al.*, 2018; Turco; Moffett, 2019).

Durante a placentação humana, os eventos que conduzem a diferenciação das células trofoblásticas envolvem mecanismos de sinalização celular que atuam de maneira orquestrada na transdução de sinais, regulando processos celulares críticos especialmente no desenvolvimento do trofoblasto extraviloso, que incluem auto renovação, proliferação, diferenciação, apoptose, invasão e migração (Gupta *et al.*, 2016; Haider *et al.*, 2022; Knöfler, 2010; Papuchova; Latos, 2022; Pollheimer; Knöfler, 2005). Dentre os mecanismos sinalizadores atuantes na biologia do trofoblasto

extraviloso humano, destaca-se a via de sinalização celular Notch (Cuman *et al.*, 2014; Dietrich *et al.*, 2022; Haider; Pollheimer; Knöfler, 2017; Knöfler *et al.*, 2019).

A sinalização Notch compreende um mecanismo de comunicação celular conservado evolutivamente em metazoários, que atua tanto na embriogênese quanto na manutenção de tecidos adultos ao regular eventos celulares essenciais à homeostase das funções orgânicas, tais como proliferação, diferenciação e apoptose. Do ponto de vista funcional, a via Notch é classificada como um mecanismo justácrino de comunicação celular, uma vez que sua ativação depende da interação direta entre células vizinhas, que se comportam como emissoras ou responsivas ao sinal por expressarem e exibirem em sua superfície proteínas ligantes e receptoras, respectivamente (Andersson; Sandberg; Lendahl, 2011; Andersson; Lendahl, 2014; Artavanis-Tsakonas; Rand; Lake, 1999; Fortini, 2002; Henrique; Schweisguth, 2019; Hori; Sen; Artavanis-Tsakonas, 2013; Kopan; Ilagan, 2009).

Em mamíferos, as células emissoras de sinal podem expressar cinco tipos específicos de proteínas transmembrana que atuam como ligantes canônicos, designados DLL1, 3 ou 4, e JAG1 ou 2, ao passo que as células responsivas ao sinal podem expressar quatro tipos de receptores transmembrana específicos, denominados Notch1, 2, 3 ou 4. Após reconhecimento e interação com determinado ligante canônico no nível de superfície celular, o receptor Notch passa por clivagens proteolíticas que culminam em sua ativação, sendo a última sequência mediada pelo complexo enzimático gama(γ)-secretase, cuja ação cliva o receptor em sua região citoplasmática, com a liberação de um fragmento ativo em termos de transdução de sinal, denominado NICD. Por sua vez, gama-secretase consiste em um complexo enzimático multiproteico formado por *Presenilin* (Presenilina) (PSEN)1 ou 2, enquanto subunidade catalítica, associada a três outros componentes que contribuem para a atividade enzimática do complexo, sendo estes PEN2, APH1 e *Nicastrin* (Nicastrina). Uma vez gerado por ação de gama-secretase e liberado no citosol, NICD se transloca ao núcleo e, em seguida, associa-se com o fator de transcrição ligante de DNA *CBF1/Su(H)/Lag-1* (CSL) e à proteína coativadora MAML, formando o complexo transcricional NICD/CSL/MAML. Por fim, NICD/CSL/MAML recruta proteínas coativadoras adicionais para então promover a transcrição de genes alvo responsivos à sinalização Notch (Andersson; Sandberg; Lendahl, 2011; Andersson; Lendahl, 2014; Fiúza; Arias, 2007; Hori; Sen; Artavanis-Tsakonas, 2013; Kopan; Ilagan, 2009; Wolfe, 2019). Dentre os alvos influenciados por Notch estão HES e HEY, repressores de

transcrição envolvidos na diferenciação e destino celular, bem como p21, c-Myc, Ciclina D1 e Bcl2, fatores atuantes no controle do ciclo celular e apoptose (Hansson; Lendahl; Chapman, 2004; Olsauskas-Kuprys; Zlobin; Osipo, 2013). Demonstrando-se ainda uma capacidade da via Notch em interagir com outros mecanismos sinalizadores existentes, observou-se que a sinalização desencadeada pelo receptor Notch1 foi capaz de regular a apoptose *in vitro* através do recrutamento do eixo de sinalização IL-6/STAT3 (Matsuno *et al.*, 2018). Estudos prévios revelaram os padrões de expressão de elementos da sinalização Notch em tecidos placentários humanos e células trofoblásticas humanas, bem como elucidaram que a via Notch regula a proliferação de células citotrofoblásticas e sua diferenciação para o fenótipo extraviloso, cenário no qual a atividade de Notch1 foi fundamental, destacando a importância da via Notch no curso gestacional, especialmente para a diferenciação do trofoblasto extraviloso (De Falco *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2014, 2016; Herr *et al.*, 2011; Plessl *et al.*, 2015; Velicky *et al.*, 2014).

No microambiente uterino, citocinas, hormônios e outros mediadores modulam as funções de células imunes locais que atuam em processos cruciais, como implantação embrionária e indução de tolerância imune materna. Por sua vez, o CTEV tem participação vital neste contexto, pois produz fatores que regulam a fisiologia placentária e sua dinâmica estrutural, bem como interage ativamente com células imunes para promover o estado de tolerância materna aos antígenos fetais. No entanto, frente à toxoplasmose este cenário benéfico pode ser prejudicado, pois, se por um lado a manutenção da gestação depende de mecanismos de supressão e tolerância imunológica, por outro lado o controle da infecção por *T. gondii* depende de uma resposta imune pró-inflamatória que pode conduzir a prejuízos gestacionais. Portanto, caso *T. gondii* atinja o microambiente placentário, um equilíbrio entre os perfis de resposta imune será essencial para controlar a infecção fetal e ao mesmo tempo garantir o progresso gestacional com prejuízos reduzidos (Ander; Diamond; Coyne, 2019; Borges *et al.*, 2019; Moffett; Shreeve, 2023). Conforme a gestação progride, a placenta humana passa por modificações estruturais para suportar o desenvolvimento fetal (Gude *et al.*, 2004; Knöfler *et al.*, 2019) que podem influenciar nas taxas de transmissão materno-fetal de *T. gondii*, contribuindo para uma susceptibilidade diferencial à infecção em função do período gestacional (Borges *et al.*, 2019; Heerema-Mckeeney, 2018; Megli; Coyne, 2022). No microambiente placentário, células trofoblásticas exercendo papéis essenciais também representam

um nicho para a proliferação e disseminação de *T. gondii*. Dentre as populações de trofoblasto humano diferenciadas, o CTEV apresenta elevada susceptibilidade à infecção por *T. gondii*, sendo descrito como a principal porta de entrada para o parasito no microambiente placentário, em função de sua menor resistência à infecção em comparação às demais populações de trofoblasto, representadas pelo ST e CTV (Abbasi *et al.*, 2003; Heerema-Mckeeney, 2018; Robbins *et al.*, 2012).

Em investigações com foco no microambiente placentário, linhagens celulares humanas estabelecidas em cultura são utilizadas como modelos de CTEV (Abbas *et al.*, 2020; Io *et al.*, 2020; Pastuschek *et al.*, 2021), dentre as quais se destaca a linhagem celular HTR-8/SVneo (Graham *et al.*, 1993). Células HTR-8/SVneo foram isoladas a partir de tecidos placentários humanos de primeiro trimestre gestacional, imortalizadas e estabelecidas em cultura como modelo de trofoblasto extraviloso humano, uma vez que *in vitro* apresentam características similares às existentes *in vivo* (Graham *et al.*, 1993). Células HTR-8/SVneo possuem capacidades migratória e invasiva, sintetizam hCG, expressam marcadores moleculares de transição epitélio-mesenquimal, são responsivas a citocinas como IL-6, IL-8 e MIF (Graham *et al.*, 1993; Jovanović; Vićovac, 2009; Jovanović *et al.*, 2010; Krivokuća *et al.*, 2015; Msheik *et al.*, 2020), bem como expressam o receptor Notch1 e sua forma clivada ativa (NICD), além do fator HES1, indicando a atividade da sinalização Notch neste modelo celular (Perlman *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2013). Além disso, a linhagem HTR-8/SVneo tem sido comumente utilizada como modelo em estudos envolvendo a susceptibilidade do trofoblasto extraviloso humano à infecção por *T. gondii*, uma vez que se mostraram altamente susceptíveis a proliferação do parasito e alteraram diferentes fatores bioquímicos e imunológicos em resposta a infecção (Almeida *et al.*, 2019; De Souza *et al.*, 2021; Faral-Tello *et al.*, 2023; Guirelli *et al.*, 2015; Milian *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2020).

Previamente, a participação da via Notch na toxoplasmose aguda experimental foi investigada, sendo demonstrado que o bloqueio da atividade de gama-secretase com o inibidor DBZ desencadeou respostas órgão-específicas para lidar com o parasitismo e com as alterações teciduais e imunes decorrentes da infecção (Briceño *et al.*, 2022). Entretanto, a participação da sinalização celular Notch, e de possíveis mecanismos associados à sua atividade, na susceptibilidade do trofoblasto extraviloso humano à infecção por *T. gondii*, ainda não foram alvos de investigação.

2 JUSTIFICATIVA

No microambiente placentário humano, o trofoblasto extraviloso desempenha funções fundamentais à placentação e manutenção da gestação, sendo um tipo celular extraembrionário especializado em explorar o ambiente decidual para promover mudanças estruturais locais e estabelecer interações com células maternas. Em contrapartida, por estar difundido no tecido decidual para possibilitar o estabelecimento do diálogo materno-fetal, este tipo celular se encontra exposto à infecção pelo protozoário parasito *Toxoplasma gondii*, que chega ao microambiente placentário, infecta células trofoblásticas extravilosas e se dissemina de tal maneira a atingir os tecidos embrionários/fetais, podendo levar ao desenvolvimento da toxoplasmose congênita. Os eventos que culminam na diferenciação do trofoblasto extraviloso e contribuem para a fisiologia adequada deste tipo celular são regulados por variados mecanismos de sinalização celular, dentre os quais se destaca a via de sinalização Notch, a qual regula processos celulares críticos à placentação humana, como proliferação, diferenciação e morte celular. Uma vez presente no hospedeiro, *T. gondii* é capaz de subverter a vigilância imune e se evadir das estratégias de defesa do organismo por manipular funções celulares e interferir no funcionamento de vias de sinalização e transdução de sinais. Previamente, foi demonstrada a contribuição da via de sinalização Notch na toxoplasmose sistêmica aguda em modelo experimental murino, através do bloqueio do complexo enzimático gama-secretase pelo inibidor químico DBZ. No entanto, evidências sobre a participação da sinalização celular Notch na infecção do trofoblasto extraviloso humano por *T. gondii* são inexistentes. Portanto, tendo-se a sinalização Notch como essencial ao trofoblasto extraviloso humano que é susceptível à infecção por *T. gondii*, a realização do presente estudo se justifica pela necessidade de se elucidar uma possível participação da sinalização celular Notch na susceptibilidade do trofoblasto extraviloso humano à infecção por *T. gondii*, vislumbrando resultados que possam dar subsídios a futuras estratégias de prevenção da transmissão materno-fetal deste patógeno.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação da sinalização celular Notch, e de possíveis mecanismos associados, na susceptibilidade de células trofoblásticas extravilosas humanas, representadas aqui pela linhagem HTR-8/SVneo utilizada como modelo experimental, à infecção por *Toxoplasma gondii*. A partir deste objetivo geral, os objetivos específicos pretendidos foram os seguintes:

- Mensurar a expressão de mRNA de genes pertencentes, ou não, ao eixo de sinalização Notch, em células HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii*;
- Avaliar a viabilidade de células HTR-8/SVneo tratadas, ou não, com inibidores de gama-secretase (DBZ, DAPT ou GSI-XIV), ou com inibidor de STAT3 (WP1066);
- Quantificar a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo tratadas, ou não, com inibidores de gama-secretase, determinando-se as taxas de inibição parasitária, ou com inibidor de STAT3;
- Quantificar a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo, cujos parasitos foram previamente tratados, ou não, com inibidores de gama-secretase, determinando-se as taxas de inibição parasitária, ou com inibidor de STAT3;
- Quantificar a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo estimuladas previamente à infecção com ligantes de Notch (rDLL4 ou rJAG1) por 6 ou 24 horas, ou não estimuladas, e após a infecção, inibidas, ou não, para gama-secretase;
- Detectar e quantificar a expressão de Notch1 clivado (c-Notch1), STAT3 fosforilada (p-STAT3) e β -Actina, em células HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii*, e tratadas, ou não, com inibidores de gama-secretase;
- Detectar a expressão de c-Notch1 e β -Actina em células HTR-8/SVneo estimuladas, ou não, com rDLL4 ou rJAG1 e, em seguida, inibidas, ou não, para gama-secretase;
- Detectar e quantificar a secreção das citocinas IFN- γ , IL-8, IL-10, MIF e TNF por células HTR-8/SVneo infectadas, ou não, por *T. gondii*, e tratadas, ou não, com inibidores de gama-secretase;
- Detectar e quantificar a secreção da citocina IL-6 por células HTR-8/SVneo estimuladas, ou não, com rDLL4 ou rJAG1, em seguida infectadas, ou não, por *T. gondii*, e por fim inibidas, ou não, para gama-secretase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

A linhagem celular HTR-8/SVneo foi cedida pela Dra. Estela Bevilacqua (USP, Brasil) e utilizada no presente estudo em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/UFU) através do comunicado N° 13/2012 (ANEXO). Células HTR-8/SVneo foram cultivadas como monocamadas aderidas em frascos de cultura celular (Greiner Bio-One GmbH, Alemanha) contendo meio RPMI-1640 suplementado com HEPES a 10 mM, NaHCO₃ a 24 mM, L-Glutamina a 2 mM, Penicilina a 100 U/mL, Estreptomicina a 100 µg/mL (reagentes Sigma-Aldrich®, EUA) e soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) (meio completo) a 10% (v/v), sendo mantidas em incubadora umidificada a 37°C e com 5% de CO₂ (condições de cultura). Para a realização dos experimentos, as células foram submetidas a passagens seriadas de crescimento através de dissociação celular enzimática promovida pelo tratamento das monocamadas confluentes com solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma-Aldrich®). Em paralelo, taquizoítos do clone 2F1 de *T. gondii*, oriundo da cepa RH modificada para expressar constitutivamente a enzima β-galactosidase e cedido pelo Dr. Vernon Carruthers (U-M, EUA), foram mantidos em células HTR-8/SVneo cultivadas em meio completo a 2% de SFB sob condições de cultura. A obtenção dos taquizoítos a partir de células HTR-8/SVneo para fins de infecção experimental foi realizada conforme descrito (Almeida *et al.*, 2021). Os cultivos de células e parasitos aqui detalhados foram realizados no Laboratório de Imunopatologia (UFU, Brasil).

4.2 INIBIDORES QUÍMICOS E PROTEÍNAS HUMANAS RECOMBINANTES

Para promover a inibição do complexo enzimático gama-secretase foram utilizados, separadamente, os inibidores químicos DBZ (Calbiochem®, Merck KGaA, Alemanha), DAPT (Sigma-Aldrich®) e GSI-XIV (Calbiochem®). Em paralelo, a fim de promover a inibição funcional da proteína STAT3, quando apropriado, foi utilizado o inibidor químico WP1066 (Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA). Todos os inibidores mencionados foram reconstituídos em DMSO absoluto e diluídos em meio completo para a execução dos tratamentos *in vitro*. Além disso, a fim de induzir a ativação da sinalização celular Notch foram utilizadas, quando apropriado, as proteínas humanas

recombinantes DLL4 His-tag e Jagged 1 Fc Chimera (R&D Systems® Inc., EUA) designadas como ligantes rDLL4 e rJAG1, os quais foram reconstituídos e diluídos em PBS 1× estéril, e imobilizados em poços de placas destinadas ao cultivo celular.

4.3 MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CELULAR

A expressão de genes pertencentes ao eixo de sinalização Notch, sendo estes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *DLL4*, *JAG1*, *JAG2*, *HES1*, *HES5* e *HEY1*, bem como de genes não pertencentes, sendo estes *APP*, *IL6R* e *GAPDH*, foi avaliada por qPCR. Para isto, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas em placa de 24 poços (7×10^4 células/400 µL/poço) por 24 h em condições de cultura e, em sequência, infectadas com *T. gondii* em meio completo a 2% de SFB (7×10^4 taquizoítos/400 µL/poço) por 24 h adicionais. Como controle, células não infectadas foram mantidas em paralelo recebendo meio completo a 2% de SFB, isento de *T. gondii*.

Após 24 h, as células foram coletadas em reagente TRIzol® (Ambion®; Life Technologies™, EUA) para extração de RNA total, conforme instruções do fabricante. Posteriormente, as concentrações de RNA total extraído dos cultivos foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, EUA), sendo que 1 µg de RNA total foi submetido ao protocolo de tratamento com DNase I (Sigma-Aldrich®) e, em sequência, utilizado para a confecção de DNA complementar (cDNA) por meio de reação desenvolvida pela enzima transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega, EUA), conforme instruções do fabricante, em aparelho Arktik™ Thermal Cycler (Thermo Scientific). Por fim, 12 ng de cDNA das amostras foram submetidos à reação de qPCR desenvolvida pelo reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) acrescido de 10 µM de *primers Forward (F)* e *Reverse (R)*, específicos para a amplificação dos alvos gênicos mencionados, em aparelho Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Life Technologies™). Os dados de amplificação das amostras para os alvos investigados foram obtidos como valores de Ct e normalizados com os respectivos valores de Ct para *GAPDH*, utilizado como gene de controle constitutivo endógeno. Por fim, os valores normalizados foram analisados, em sequência, quanto a expressão gênica relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001) e os resultados foram demonstrados como valores de expressão de mRNA para os alvos investigados. Em complementação, as sequências conhecidas de bases nucleotídicas

dos *primers* *F* e *R* utilizados para detecção dos alvos humanos avaliados estão descritas a seguir, sendo que para os alvos cujas sequências não foram informadas por seu fabricante constam descritos, em substituição, os respectivos códigos de catálogo comercial: *NOTCH1* *F*-5'-GGCACGTGTATTGACGACGT-3' *R*-5'-CAGGAGAAGCTCTCATAGTCC-3'; *NOTCH2* *F*-5'-CACCTTGACAGCCCGCTACT-3' *R*-5'-GGTTGCGAATCAGAATCTGGA-3'; *NOTCH3* *F*-5'-CAGGGCCACTATGTGAGAACC-3' *R*-5'-TCGGTGTCTGACAGTCG-3'; *NOTCH4* *F*-5'-AGGCCACAGCAGGATCAC-3' *R*-5'-AGGTGGGGCCTTCAAAC-3'; *DLL1* *F*-5'-ATGCCTTCGGCCACTTCAC-3' *R*-5'-CACATCCAGGCAGGCAGAT; *DLL4* *F*-5'-CTTGTGAATGTCCCCCAAC-3' *R*-5'-ACCTCGGTTCAAGGCACTGTC-3'; *JAG1* *F*-5'-GGGCCCCGAATGTAACAGA-3' *R*-5'-AGTACAGGCCTTGCCAGCC-3'; *JAG2* *F*-5'-ATCCCCTTCAGTTCGCCT-3' *R*-5'-ATGCGACACTCGTCGATC-3'; *HES1* QT00039648; *HES5* QT00202699; *HEY1* QT00035644; *APP* *F*-5'-ACACCGTCGCCAAAGAGACAT-3' *R*-5'-CACACAACTCTACCCCTCGGA-3'; *IL6R* *F*-5'-CCCCTCAGCAATGTTGTTTGT-3' *R*-5'-CTCCGGGACTGCTAACTGG-3'; *GAPDH* *F*-5'-ATGCCATCACTGCCACCC-3' *R*-5'-ACCTTGCCCACAGCCTTG-3'.

4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade de células HTR-8/SVneo frente aos tratamentos com inibidores de gama-secretase e de STAT3 foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (Mosmann, 1983). Para isto, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/100 μ L ou 1×10^4 células/200 μ L/poço) por 24 h em condições de cultura e, em sequência, tratadas em meio completo a 10% de SFB com DBZ (0,1; 0,5; 1; 5; 10; ou 20 μ M), DAPT (1; 5; 10; 20; 40; ou 80 μ M), GSI-XIV (1; 5; 10; 20; 40; ou 80 μ M) ou WP1066 (0,75; 1,5; 3; 6; ou 12 μ M) por 24 h adicionais. Células não tratadas foram conduzidas em paralelo, sendo incubadas com DMSO diluído em meio completo, como condição veículo referente às maiores concentrações dos inibidores, ou apenas com meio completo (isento de DMSO) como controle. Após 24 h, o meio de cultivo metabolizado foi removido dos poços e as células foram incubadas por 4 h em cultura com o reagente MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*; Sigma-Aldrich®), diluído a 0,5 mg/mL em meio completo a 10% de SFB. Transcorridas 4 h, os cristais de formazan produzidos pelas células como produto da conversão bioquímica do reagente de MTT foram solubilizados com

solução de SDS a 10% em N,N-Dimetilformamida a 50% (p/v) e a absorbância das amostras foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis calculadas tendo como referência células não tratadas apenas incubadas com meio, as quais foram consideradas como controle de 100% em viabilidade celular.

4.5 AVALIAÇÃO DO PARASITISMO CELULAR

Os efeitos dos inibidores de gama-secretase e de STAT3, bem como dos ligantes rDLL4 e rJAG1, na proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo foram avaliados por ensaio colorimétrico de β -galactosidase (Teo *et al.*, 2007). Para isto, quatro abordagens experimentais distintas foram conduzidas, como descrito a seguir.

Em uma primeira etapa, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/100 μ L ou 1×10^4 células/200 μ L/poço) por 24 h em condições de cultura e, em sequência, infectadas com *T. gondii* em meio completo a 2% de SFB (1×10^4 taquizoítos/100 μ L ou 1×10^4 taquizoítos/200 μ L/poço) por 3 h. Em seguida, os poços foram cuidadosamente lavados com meio de cultivo incompleto (isento de L-Glutamina e SFB), para remoção dos taquizoítos livres não internalizados na monocamada celular, e as células infectadas foram tratadas, em meio completo a 10% de SFB, com DBZ (0,1; 0,5; 1; ou 5 μ M), DAPT (1; 5; 10; 20; ou 40 μ M), GSI-XIV (1; 5; 10; ou 20 μ M) ou WP1066 (0,75; 1,5; 3; ou 6 μ M) por 24 h. Como controles, células não tratadas foram conduzidas em paralelo, sendo incubadas com DMSO diluído em meio completo a 10% de SFB, enquanto veículo referente às maiores concentrações dos inibidores, ou apenas incubadas com meio completo a 10% de SFB (isento de DMSO). Após 24 h, as células foram submetidas ao ensaio de quantificação da proliferação de *T. gondii* por meio da mensuração da atividade enzimática de β -galactosidase, expressa pelo clone 2F1 de *T. gondii*, através de incubação com o substrato CPRG (*Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside*; Roche®, Alemanha). A absorbância das amostras foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices) e os resultados foram expressos em número de parasitos ($\times 10^3$), calculados com referência a curvas padrão duplo-seriadas de taquizoítos livres, em quantidades determinadas, submetidas ao ensaio de β -galactosidase em paralelo às amostras.

Em uma segunda etapa, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas em placas de 24 poços (7×10^4 células/400 μ L/poço) por 24 h em condições de cultura e, em sequência, infectadas com *T. gondii* em meio completo a 2% de SFB (7×10^4 taquizoítos/400 μ L/poço) por 3 h. Como controle, células não infectadas foram mantidas em paralelo, recebendo meio completo a 2% de SFB, isento de *T. gondii*. Em seguida, os poços foram lavados com meio incompleto, para remoção dos taquizoítos livres não internalizados, e as células infectadas, bem como as células não infectadas, foram tratadas, em meio completo a 10% de SFB, com DBZ (5 μ M), DAPT (40 μ M) ou GSI-XIV (1 μ M) por 24 h. Células infectadas, ou não, apenas incubadas com meio completo isento de inibidores foram mantidas em paralelo como controle de células não tratadas. Transcorridas 24 h, os sobrenadantes foram coletados dos poços e armazenados a -80°C para uso posterior em dosagem de citocinas (item 4.7). Por fim, as amostras de células infectadas foram submetidas ao ensaio de β -galactosidase, conforme procedimentos descritos acima.

Em uma terceira etapa, taquizoítos de *T. gondii* na concentração de 5×10^4 parasitos/100 μ L foram tratados, em meio completo a 2% de SFB, com DBZ (5 μ M), DAPT (40 μ M), GSI-XIV (1 μ M) ou WP1066 (3 μ M), ou incubados apenas com meio completo isento de inibidores como controle não tratado, durante 1 h em condições de cultura. Em seguida, os taquizoítos foram centrifugados (2000 rpm, 10 min) para remoção dos tratamentos, suspensos em novo meio completo a 2% de SFB e adicionados a células HTR-8/SVneo previamente cultivadas por 24 h em placa de 96 poços (1×10^4 células/100 μ L/poço). Então, as células infectadas foram mantidas em condições de cultura por 3 h adicionais, em seguida os poços foram lavados com meio incompleto para remoção dos taquizoítos livres não internalizados e as células infectadas foram incubadas com meio completo a 10% de SFB por 24 h. Por fim, as células foram submetidas ao ensaio de β -galactosidase, conforme descrito acima.

Em uma quarta etapa, placas de 96 poços para cultivo celular foram previamente incubadas (100 μ L/poço) *overnight* a $2-8^\circ\text{C}$ com 1 μ g/mL, preparado em PBS 1 $\times$ estéril, de rDLL4, ou rJAG1, ou ainda de BSA (Sigma-Aldrich®) utilizada como proteína controle não efetiva na ativação da sinalização Notch. Em sequência, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas nestas placas (1×10^4 células/100 μ L/poço) com as proteínas previamente imobilizadas na superfície dos poços, por 6 ou 24 h em condições de cultura. Após cada tempo de cultivo, as células foram infectadas com *T. gondii* em meio completo a 2% de SFB (1×10^4

taquizoítos/100 μ L/poço) por 3 h, os poços foram então lavados com meio incompleto para remoção dos taquizoítos livres não internalizados e as células infectadas foram tratadas, em meio completo a 10% de SFB, com DBZ (5 μ M), ou incubadas com DMSO (0,23%) como controle de células não tratadas (veículo), por 24 h. Ao fim, as células foram submetidas ao ensaio de β -galactosidase, conforme descrito acima.

Em uma análise final, os dados da segunda e terceira etapas foram utilizados para cálculo das porcentagens de inibição parasitária frente aos tratamentos com DBZ, DAPT ou GSI-XIV, utilizando-se como parâmetros de não ocorrência de inibição as condições controle em que células ou parasitos foram incubados apenas com meio.

4.6 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA CELULAR

A detecção e quantificação das expressões em nível celular da forma clivada do receptor Notch1 em seu domínio intracelular, da forma fosforilada da proteína intracelular STAT3 e da proteína de controle constitutivo endógeno β -Actina, em células HTR-8/SVneo, foram avaliadas por reações de *Western Blotting*. Para essa finalidade, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas em placas de 6 poços (3×10^5 células/1500 μ L/poço) por 24 h em condições de cultura e, em sequência, infectadas com *T. gondii* em meio completo a 2% de SFB (3×10^5 taquizoítos/1500 μ L/poço) por 3 h. Como controle, células não infectadas foram mantidas em paralelo, recebendo meio completo a 2% de SFB, isento de *T. gondii*. Em seguida, os poços foram lavados com meio incompleto, para remoção dos taquizoítos livres não internalizados, e as células infectadas, bem como as células não infectadas, foram tratadas, em meio completo a 10% de SFB, com DBZ (5 μ M), DAPT (40 μ M) ou GSI-XIV (1 μ M) por 24 h. Células infectadas, ou não, apenas incubadas com meio completo isento de inibidores foram mantidas em paralelo como controle de células não tratadas. Em um protocolo adicional, placas de 6 poços foram incubadas (1000 μ L/poço) *overnight* a 2-8°C com 1 μ g/mL, em PBS 1 $\times$ estéril, de rDLL4, rJAG1 ou BSA e, em sequência, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas nestas placas ($3,5 \times 10^5$ células/1000 μ L/poço) por 24 h em condições de cultura. Após, as células foram tratadas, em meio completo a 10% de SFB, com DBZ (5 μ M), ou incubadas com DMSO (0,23%) como controle (veículo), por 24 h.

Finalizados ambos os experimentos em cultura, as células foram incubadas a 0°C por 15 min com solução de extração proteica, constituída de tampão de lise RIPA

(Sigma-Aldrich®) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (cOmplete™ Mini EDTA-free; Roche®), e inibidores de fosfatases Na_3VO_4 a 1 mM e NaF a 25 mM (Sigma-Aldrich®). Em seguida, os lisados celulares foram submetidos a quatro ciclos de congelamento/descongelamento e centrifugados (11200 rpm, 15 min, 4°C) para obtenção das amostras de sobrenadante contendo as proteínas totais extraídas, as quais foram coletadas e conservadas a -80°C. Posteriormente, alíquotas destas amostras foram submetidas à dosagem proteica desenvolvida com o *kit* Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), conforme instruções do fabricante, e as concentrações proteicas foram expressas em µg/mL. Em sequência, 80 µg de proteínas totais foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 8% ou 10% sob condições redutoras e desnaturantes (SDS-PAGE), e as proteínas segregadas em função do peso molecular foram então eletrotransferidas dos géis para membranas de PVDF (Immobilon®-FL; Merck Millipore Ltd., Irlanda). Posteriormente, as membranas foram incubadas, sob agitação constante por 1 h a temperatura ambiente, em tampão de *blotting* [Tris-HCl a 25 mM; NaCl a 150 mM; Tween20 a 0,1% (v/v); pH 7,4] acrescido de leite em pó desnatado (Itambé, Brasil) a 5% (p/v), para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Em seguida, as membranas foram incubadas, sob agitação constante *overnight* a 4°C, com anticorpos primários: monoclonal de coelho anti-Notch1 clivado (V^{1754}) (1:500; Cell Signaling Technology® Inc., EUA) ou monoclonal de camundongo anti- β -Actina (1:3000; Sigma-Aldrich®), ambos diluídos em tampão de *blotting* a 2% de leite desnatado, ou monoclonal de camundongo anti-STAT3 fosforilada (Y^{705}) (1:500; Santa Cruz Biotechnology) diluído em tampão de *blotting* isento de leite desnatado. Após, as membranas foram lavadas em tampão de *blotting* e incubadas, sob agitação constante por 2 h a temperatura ambiente, com anticorpos secundários policlonais de cabra anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase (1:3000; Sigma-Aldrich®) diluídos em tampão de *blotting* a 2% de leite desnatado. Por fim, as membranas foram novamente lavadas em tampão e as reações foram desenvolvidas por quimioluminescência utilizando o *kit* SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific) em transiluminador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA), sendo documentadas e analisadas por densitometria através do programa Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories). Os pesos moleculares estimados para Notch1 clivado, STAT3 fosforilada e β -Actina foram de 110, 91-86 e 42 kDa, respectivamente, de acordo com os fabricantes dos anticorpos primários mencionados. Os resultados

obtidos foram demonstrados como bandas representativas das proteínas detectadas e níveis de expressão relativa para Notch1 clivado e STAT3 fosforilada nas amostras, normalizados com os respectivos níveis de β -Actina, todos obtidos por densitometria das bandas proteicas. Além disso, os valores de expressão relativa obtidos em cada grupo, foram, por fim, normalizados em função da expressão do grupo controle de células não infectadas e não tratadas, definida como sendo igual a 1.

4.7 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SECRETADAS

As amostras de sobrenadantes mencionadas previamente (item 4.5), obtidas do cultivo de células HTR-8/SVneo infectadas, ou não, com *T. gondii*, bem como tratadas, ou não, com os inibidores de gama-secretase (DBZ, DAPT ou GSI-XIV), foram submetidas à dosagem das citocinas humanas IL-8, IL-10, IFN- γ , MIF e TNF por ensaio imunoenzimático ELISA, conforme recomendações dos fabricantes dos *kits* para detecção e quantificação de IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF (BD OptEIA™; BD Biosciences, EUA), bem como de MIF (DuoSet®; R&D Systems®).

Em um protocolo experimental adicional, placas de 24 poços foram incubadas (250 μ L/poço) *overnight* a 2-8°C com 1 μ g/mL, em PBS 1× estéril, de rDLL4, rJAG1 ou BSA e, em sequência, células HTR-8/SVneo, em meio completo a 10% de SFB, foram cultivadas nestas placas ($7,5 \times 10^4$ células/250 μ L/poço) por 24 h em condições de cultura. Após, as células foram infectadas com *T. gondii* em meio completo a 2% de SFB ($7,5 \times 10^4$ taquizoítos/250 μ L/poço) por 3 h e, como controle, células não infectadas foram mantidas em paralelo, recebendo meio completo a 2% de SFB, isento de *T. gondii*. Em seguida, os poços foram lavados com meio incompleto, para remoção dos taquizoítos livres não internalizados, e as células infectadas, bem como as células não infectadas, foram tratadas, em meio completo a 10% de SFB, com DBZ (5 μ M), ou incubadas com DMSO (0,23%) como controle (veículo), por 24 h. Por fim, os sobrenadantes foram coletados dos poços, armazenados a -80°C e posteriormente submetidos à dosagem da citocina humana IL-6 por ELISA, conforme recomendações do fabricante do *kit* para detecção e quantificação de IL-6 (BD OptEIA™; BD Biosciences). Por fim, os níveis de secreção das diferentes citocinas mensuradas foram expressos em pg/mL e as concentrações estimadas como limite de detecção para IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, MIF e TNF foram de 6,25 pg/mL, 4,69 pg/mL, 3,13 pg/mL, 7,81 pg/mL, 31,25 pg/mL e 7,81 pg/mL, respectivamente.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

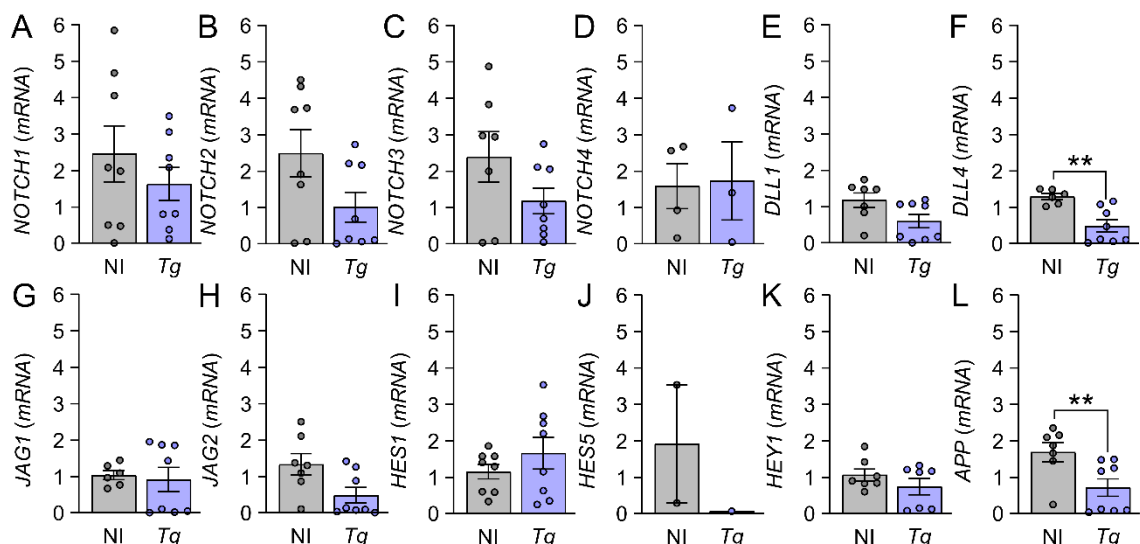
Os dados foram obtidos a partir de experimentos independentes realizados com no mínimo seis replicatas (“n” amostral) por grupo, sendo expressos como a média $\pm$ o erro padrão da média e analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism® versão 10 (GraphPad Software Inc., EUA). Para as análises estatísticas, os dados foram inicialmente submetidos à identificação de possíveis valores discrepantes *outliers*, os quais foram excluídos quando recomendado, e os valores definitivos foram submetidos a análises de normalidade para determinação dos testes estatísticos a serem escolhidos, com base na natureza paramétrica ou não paramétrica dos grupos. As diferenças existentes entre dois grupos foram determinadas por teste *t* não pareado, para dados paramétricos, ou por teste Mann-Whitney, para dados não paramétricos. Já as diferenças entre grupos múltiplos foram determinadas por teste *one-way* ANOVA com comparações múltiplas de Sidak, para dados paramétricos, ou por teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn, para dados não paramétricos. Por fim, todas as diferenças observadas foram consideradas como estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CÉLULAS HTR-8/SVneo REDUZEM A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM GAMA-SECRETASE FRENTE À INFECÇÃO POR *T. gondii*

Inicialmente, foi avaliado o impacto da infecção por *T. gondii* na expressão de mRNA de genes atuantes na sinalização Notch em células HTR-8/SVneo, sendo estes os codificantes dos receptores Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* e *NOTCH4*), de ligantes canônicos dos receptores (*DLL1*, *DLL4*, *JAG1* e *JAG2*), bem como de elementos *downstream* no eixo (*HES1*, *HES5* e *HEY1*). Observou-se que em resposta à infecção as células reduziram significativamente a expressão de *DLL4* ($P=0,0023$; Figura 1F) e, embora não estatisticamente significativo, atenuaram a expressão dos demais genes avaliados, exceto *NOTCH4* e *HES1*. Interessantemente, *NOTCH4* se mostrou pouco expresso, tanto por células infectadas ($n=3$ de 8) quanto não infectadas ($n=4$ de 8) em relação aos demais genes *NOTCH*, cujas expressões foram similares por células infectadas ($n=8$) e não infectadas ($n=7$ ou 8). De modo semelhante, dentre os genes *downstream* *HES5* se mostrou fracamente expresso, tanto por células infectadas ($n=1$ de 8) quanto não infectadas ($n=2$ de 8), ao contrário de *HES1* e *HEY1*, cujas expressões foram similares por células infectadas ($n=7$ ou 8) e não infectadas ($n=7$ ou 8). Além disso, a expressão de *APP*, enquanto gene independente da sinalização Notch mas associado à atividade de gama-secretase, foi também reduzida frente a infecção por *T. gondii* ($P=0,0093$; Figura 1L).

Figura 1 – Efeito da infecção por *T. gondii* na expressão gênica celular.



Fonte: O próprio autor. (A-L) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram infectadas, ou não, com *T. gondii*, por 24 h, e submetidas à mensuração da expressão gênica celular, sendo os resultados demonstrados como expressão de mRNA para os genes avaliados; (NI): células não infectadas; (Tg): células infectadas com *T. gondii*; Diferenças estatísticas significativas (*) foram determinadas por teste *t* não pareado (F) ou por teste Mann-Whitney (L); (**): $P < 0,01$.

5.2 INIBIDORES DE GAMA-SECRETASE REDUZEM DIFERENCIALMENTE A PROLIFERAÇÃO DE *T. gondii* EM CÉLULAS HTR-8/SVneo

Em continuidade aos objetivos, buscou-se avaliar os efeitos dos inibidores de gama-secretase na proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo. Primeiramente, células HTR-8/SVneo foram analisadas quanto aos índices de viabilidade frente aos tratamentos com DBZ, DAPT ou GSI-XIV, a fim de se descartar, em uso posterior, doses potencialmente citotóxicas, e selecionar doses adequadas a serem utilizadas nos ensaios de avaliação do parasitismo celular. Assim, ao serem comparadas com o controle não tratado (meio) as células apresentaram viabilidade significativamente reduzida quando tratadas por 24 h com DBZ a 10 μM ($P < 0,0001$) ou 20 μM ($P < 0,0001$) (Figura 2A), com DAPT a 80 μM ($P < 0,0001$) (Figura 2B) ou com GSI-XIV a 40 μM ($P = 0,0031$) ou 80 μM ($P < 0,0001$) (Figura 2C). Em paralelo, as células foram também tratadas com DMSO como condição veículo, cujas doses foram calculadas com referência às maiores concentrações testadas dos inibidores, sendo a 0,93% para DBZ (20 μM) e 0,8% para DAPT e GSI-XIV (80 μM). Similarmente ao observado para as maiores concentrações dos inibidores, quando comparadas com o controle (meio) as células também apresentaram viabilidade reduzida ao serem tratadas com DMSO, a 0,93% referente a DBZ ($P < 0,0001$) (Figura 2A) ou 0,8% referente a DAPT ($P < 0,0001$) (Figura 2B) e GSI-XIV ($P = 0,0017$) (Figura 2C).

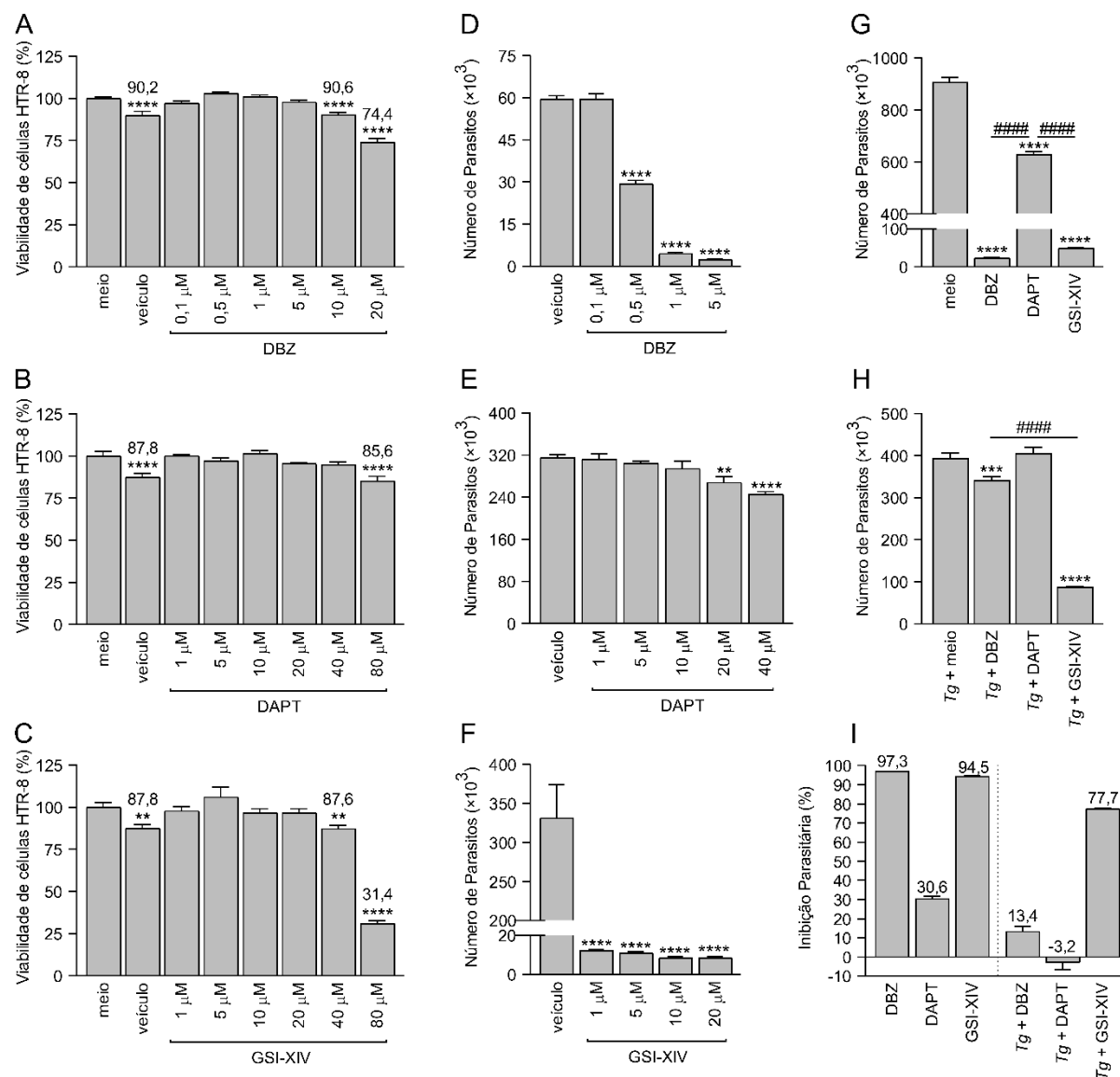
A partir destes resultados, as doses até 5 μM para DBZ, 40 μM para DAPT e 20 μM para GSI-XIV foram utilizadas no tratamento por 24 h de células HTR-8/SVneo infectadas, a fim de se determinar seus efeitos na proliferação de *T. gondii* em uma próxima etapa. Portanto, os dados obtidos revelaram que 0,5 μM , 1 μM e 5 μM de DBZ reduziram significativamente ($P < 0,0001$) o número de parasitos em células HTR-8/SVneo em comparação com o controle de células tratadas com veículo (DMSO a 0,23%) (Figura 2D). Similarmente, quando tratadas com DAPT, as células apresentaram redução do parasitismo, sendo significativa a 20 μM ($P = 0,0010$) e 40 μM ($P < 0,0001$) em comparação com veículo (DMSO a 0,8%) (Figura 2E), e quando tratadas com GSI-XIV, as células também apresentaram redução da carga parasitária,

neste caso em todas as doses às quais foram submetidas ($P<0,0001$) comparadas com veículo (DMSO a 0,17%) (Figura 2F). Observados estes fenômenos, as doses de 5 μM para DBZ, 40 μM para DAPT e 1 μM para GSI-XIV foram selecionadas para os experimentos que se seguiram, uma vez que apresentaram efeitos significativos.

Em seguida, buscou-se comparar a eficiência dos inibidores quando empregados paralelamente. Reforçando os fenômenos já observados, DBZ, DAPT ou GSI-XIV reduziram significativamente ($P<0,0001$) o parasitismo após 24 h de tratamento em comparação com o controle não tratado (meio), sendo que células infectadas tratadas com DBZ ou GSI-XIV apresentaram quantidades de parasitos significativamente menores em relação às células tratadas com DAPT ($P<0,0001$), evidenciando, portanto, maiores eficiências de DBZ e GSI-XIV que de DAPT, mesmo este em maior concentração que os demais (Figura 2G). Em uma abordagem adicional, as células foram infectadas com taquizoítos previamente incubados com os inibidores, de maneira a direcionar os tratamentos aos parasitos, possibilitando avaliar uma possível atuação exclusiva dos inibidores em *T. gondii* com efeitos em sua capacidade proliferativa. Os resultados revelaram que o tratamento de *T. gondii* com DAPT não promoveu alteração significativa no número de parasitos em relação ao controle não tratado (meio) (Figura 2H), sugerindo que a ação de DAPT, já evidenciada, no controle do parasitismo, ocorreu por mecanismos desencadeados na própria célula hospedeira. Por outro lado, quantidades significativamente menores de parasitos foram observadas em células infectadas com *T. gondii* previamente tratado com DBZ ($P=0,0008$) ou GSI-XIV ($P<0,0001$) em relação ao controle não tratado (meio), e, quando comparadas entre si, a ação de GSI-XIV em *T. gondii* apresentou efeito mais significativo ($P<0,0001$) que a ação desempenhada por DBZ (Figura 2H). Estes resultados sugerem que, ao contrário de DAPT, cuja ação foi restrita à célula hospedeira, DBZ e GSI-XIV atuaram para o controle do parasitismo não somente com efeito na célula hospedeira, mas também com ação em *T. gondii*. Por fim, a partir de uma análise complementar que evidenciou as porcentagens de inibição parasitária em resposta aos tratamentos (Figura 2I), observou-se que, enquanto GSI-XIV atuou inibindo o parasitismo ao ser utilizado tanto no tratamento de células infectadas (94,5%) quanto de *T. gondii* (77,7%), DAPT, por outro lado, atuou com menor efeito inibitório ao ser usado em células infectadas (30,6%), não apresentando ação sobre *T. gondii* (-3,2%). Por sua vez, DBZ atuou de maneira diferenciada ao inibir o parasitismo, uma vez que exerceu um efeito robusto no tratamento de células

infectadas (97,3%), semelhante a GSI-XIV, mas desencadeou um efeito pouco intenso no parasito em si (13,4%), aproximando-se ao efeito nulo de DAPT sobre *T. gondii*.

Figura 2 – Efeitos de DBZ, DAPT e GSI-XIV na viabilidade celular e parasitismo.

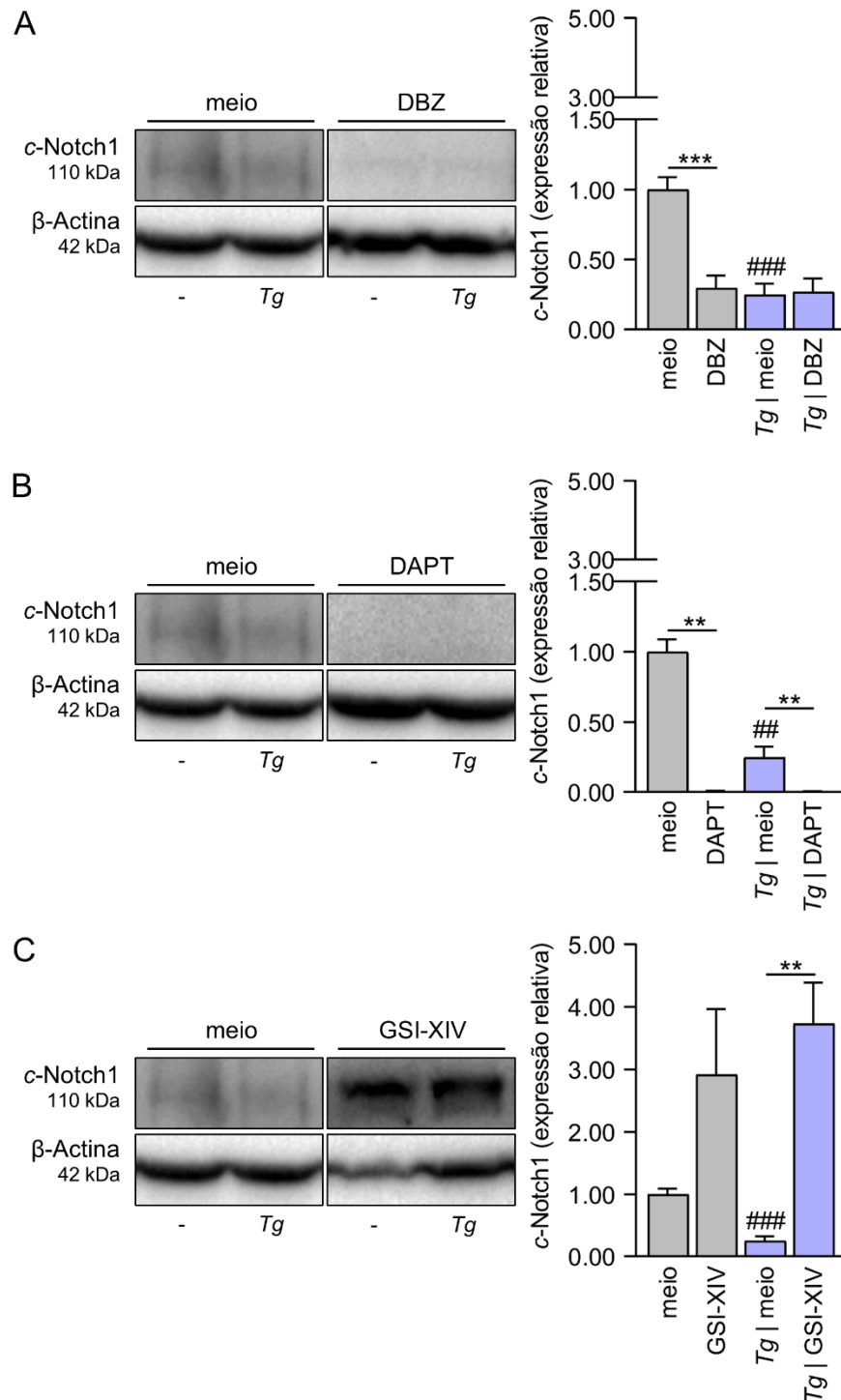


Fonte: O próprio autor. (A-C) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram tratadas com doses de DBZ, DAPT ou GSI-XIV, ou com veículo, ou não tratadas (meio), por 24 h, e submetidas à avaliação de viabilidade celular, sendo os resultados expressos em porcentagem de viabilidade, com as porcentagens significativas, em relação ao controle (meio), descritas junto ao símbolo (*); (D-F) Células cultivadas por 24 h foram infectadas com *T. gondii*, tratadas com doses dos inibidores, ou com veículo, por 24 h, e submetidas à quantificação da proliferação de *T. gondii*, sendo os resultados expressos em número de parasitos ($\times 10^3$); (G-I) Células cultivadas por 24 h foram (G) infectadas com *T. gondii* e tratadas, ou não (meio), com inibidores por 24 h, ou, (H) foram infectadas com *T. gondii* previamente tratado com os inibidores, ou não (meio), por 1 h, e cultivadas por 24 h adicionais, sendo submetidas à quantificação da proliferação de *T. gondii*, cujos resultados obtidos em número de parasitos ($\times 10^3$) foram empregados no cálculo das porcentagens de inibição parasitária (I); (Tg +): *T. gondii* tratado com inibidores; Diferenças estatísticas significativas (*#) foram determinadas por teste ANOVA com comparações múltiplas de Sidak (A-H); (*): comparação com as condições meio ou veículo; (**): $P < 0,01$; (***): $P < 0,001$; (****#): $P < 0,0001$.

5.3 CÉLULAS HTR-8/SVneo APRESENTAM ATIVAÇÃO DE NOTCH1 REDUZIDA FRENTE À INFECÇÃO POR *T. gondii* E AOS INIBIDORES DBZ E DAPT

Verificado o controle do parasitismo exercido pelos inibidores de gama-secretase, as análises seguintes buscaram elucidar os mecanismos pelos quais atuaram DBZ, DAPT e GSI-XIV. Neste sentido, a expressão do receptor Notch1 clivado em seu domínio intracelular (NICD), como demonstrativo de sua ativação, foi avaliada em células HTR-8/SVneo submetidas, ou não, à infecção e/ou aos tratamentos com DBZ, DAPT ou GSI-XIV. Por meio da verificação das bandas proteicas e dos dados de expressão relativa para Notch1 clivado (c-Notch1), verificou-se que, em ausência de tratamentos (meio), células infectadas com *T. gondii* reduziram significativamente a expressão de c-Notch1 ($P=0,0002$; Figura 3A e C; $P=0,0043$ Figura 3B) em comparação com células não infectadas. Já em ausência de infecção, quando comparadas com o respectivo controle não tratado, células tratadas com DBZ ($P=0,0002$; Figura 3A) ou DAPT ($P=0,0022$; Figura 3B) também reduziram significativamente a expressão de c-Notch1. Ainda em ausência de infecção, quando tratadas com GSI-XIV as células não apresentaram expressão de c-Notch1 reduzida, mas, ao contrário, elevaram a expressão do receptor clivado em relação ao controle não tratado (Figura 3C), embora não estatisticamente significativo. Além disso, quando avaliadas nos cenários em que foi evidenciado controle do parasitismo (Figura 2D-G), células infectadas e tratadas com DAPT apresentaram redução significativa da expressão de c-Notch1 em comparação com o controle de células infectadas e não tratadas ($P=0,0043$), fenômeno este não observado em células infectadas e tratadas com DBZ, em que a expressão de c-Notch1 se manteve similar ao controle infectado não tratado (Figura 3A). Já quando infectadas e tratadas com GSI-XIV, as células apresentaram expressão de c-Notch1 significativamente aumentada em relação ao controle infectado e não tratado ($P=0,0011$; Figura 3C). Em conjunto, estes resultados demonstram que a ativação do receptor Notch1 foi reduzida em células HTR-8/SVneo tanto frente à infecção por *T. gondii* quanto em resposta a DBZ ou DAPT, mas não em resposta a GSI-XIV. Além disso, nota-se que os efeitos supressores de DBZ e DAPT, ou indutor de GSI-XIV, na ativação de Notch1, manifestaram-se independente da infecção, visto que, quando tratadas, tanto células infectadas quanto não infectadas, não apresentaram diferenças significativas entre si na expressão de c-Notch1.

Figura 3 – Ativação do receptor Notch1 em células HTR-8/SVneo.



Fonte: O próprio autor. (A-C) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram infectadas, ou não, com *T. gondii*, tratadas com DBZ, DAPT ou GSI-XIV, ou não tratadas (meio), por 24 h, e submetidas à avaliação da expressão do receptor Notch1 clivado (c-Notch1), bem como do controle endógeno β-Actina, sendo os resultados demonstrados por bandas representativas de ambas as proteínas e dados de expressão relativa de c-Notch1; (-): células não infectadas; (Tg): células infectadas com *T. gondii*; Diferenças estatísticas significativas (*) foram determinadas por teste *t* não pareado (A e C) ou por teste Mann-Whitney (B); (#): comparação com o respectivo controle de células não infectadas; (**#): $P < 0,01$; (***###): $P < 0,001$.

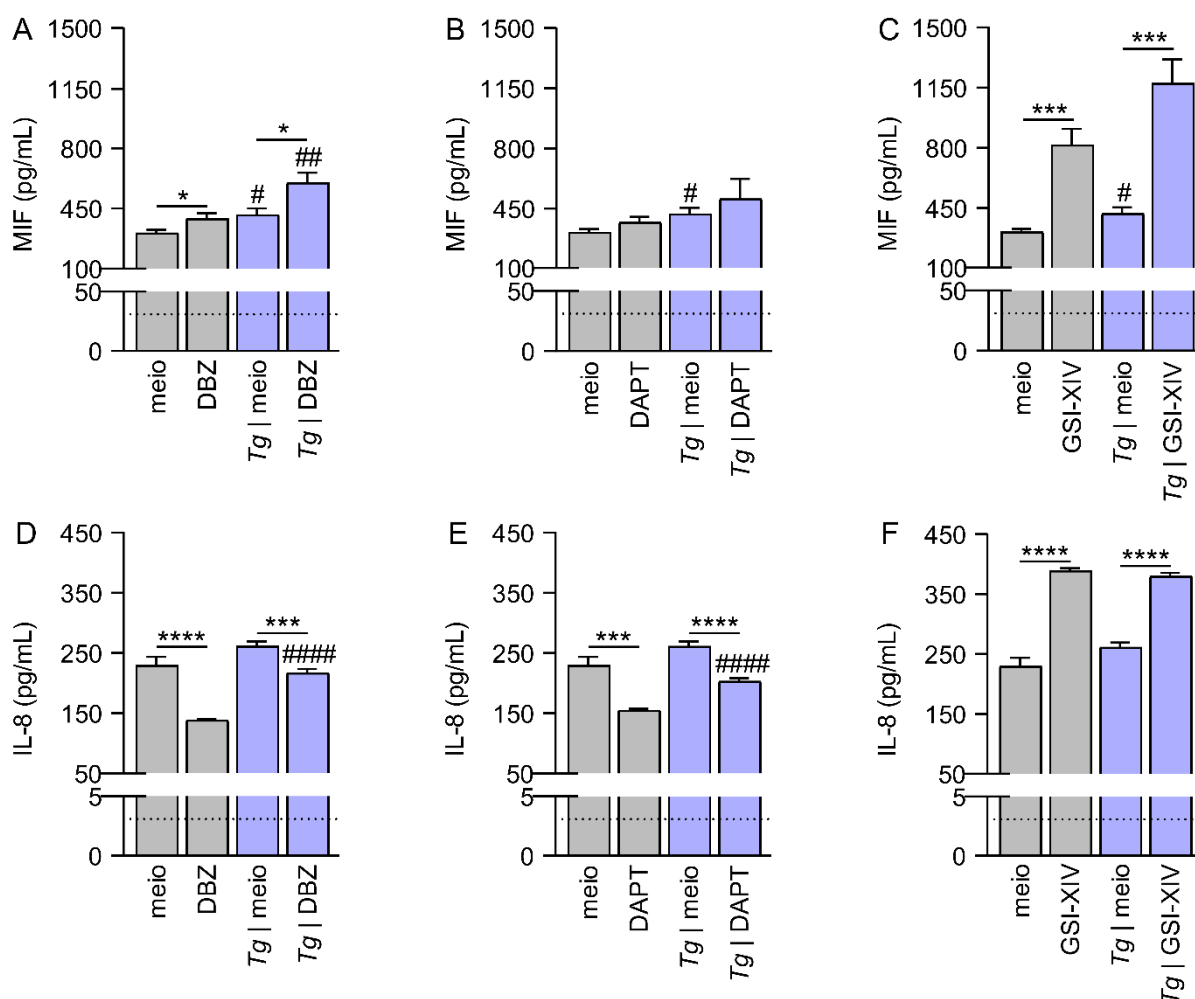
5.4 INIBIDORES DE GAMA-SECRETASE MODULAM DIFERENCIALMENTE A SECREÇÃO DE MIF E IL-8 POR CÉLULAS HTR-8/SVneo

Verificadas a inibição ou ativação do receptor Notch1, em continuidade à exploração dos possíveis mecanismos ligados à redução do parasitismo, a secreção das citocinas MIF e IL-8, envolvidas na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii* (Milian *et al.*, 2019), bem como IFN- γ , IL-10 e TNF, atuantes na resposta imune celular frente à infecção por *T. gondii* (Denkers; Gazzinelli, 1998; Miller *et al.*, 2009), foi também avaliada no presente contexto.

Em relação aos níveis de MIF, células HTR-8/SVneo infectadas e isentas de tratamentos aumentaram significativamente a produção desta citocina quando comparadas ao respectivo controle de células não infectadas e não tratadas ($P=0,0287$; Figura 4A-C). Além disso, células infectadas e tratadas com DBZ também elevaram de modo significativo ($P=0,0093$) a produção de MIF quando comparadas com células não infectadas e tratadas (Figura 4A). Semelhantemente, em células tratadas com DAPT ou GSI-XIV a infecção pareceu elevar a produção de MIF em relação às células não infectadas e tratadas, mas não de forma significativa. Quando comparados com os respectivos controles não tratados (meio), os tratamentos com DBZ ou GSI-XIV promoveram significativo aumento nos níveis de MIF, tanto em células infectadas ($P=0,0180$; Figura 4A; $P=0,0001$; Figura 4C) quanto não infectadas ($P=0,0254$; Figura 4A; $P=0,0001$; Figura 4C). Similarmente, DAPT pareceu induzir MIF em células infectadas ou não, porém de maneira não significativa. Já em relação à produção de IL-8, células infectadas e isentas de tratamentos aparentemente aumentaram a produção desta citocina, embora de modo não significativo (Figura 4D-F). Por outro lado, células infectadas e tratadas com DBZ ou DAPT, mas não com GSI-XIV, elevaram significativamente ($P<0,0001$) a produção de IL-8 em comparação com seus respectivos controles não infectados e tratados (Figura 4D e E). Quando comparados com os respectivos controles não tratados, os tratamentos com DBZ ou DAPT desencadearam redução significativa na produção de IL-8, tanto em células infectadas ($P=0,0005$; Figura 4D; $P<0,0001$; Figura 4E) quanto não infectadas ($P<0,0001$; Figura 4D; $P=0,0002$; Figura 4E), sendo que, ao contrário, o tratamento com GSI-XIV promoveu aumentos significativos ($P<0,0001$) na secreção desta citocina, independentemente da infecção (Figura 4F). Por fim, a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF, também avaliadas, não foi evidenciada em quaisquer

condições experimentais conduzidas, uma vez que os valores de produção obtidos foram inferiores aos limites de detecção destas citocinas (dados não mostrados). Em suma, os resultados demonstram que os inibidores de gama-secretase modulam diferencialmente a secreção de MIF e IL-8 por células HTR-8/SVneo, de maneira independente da infecção por *T. gondii*.

Figura 4 – Secreção das citocinas MIF e IL-8 por células HTR-8/SVneo.

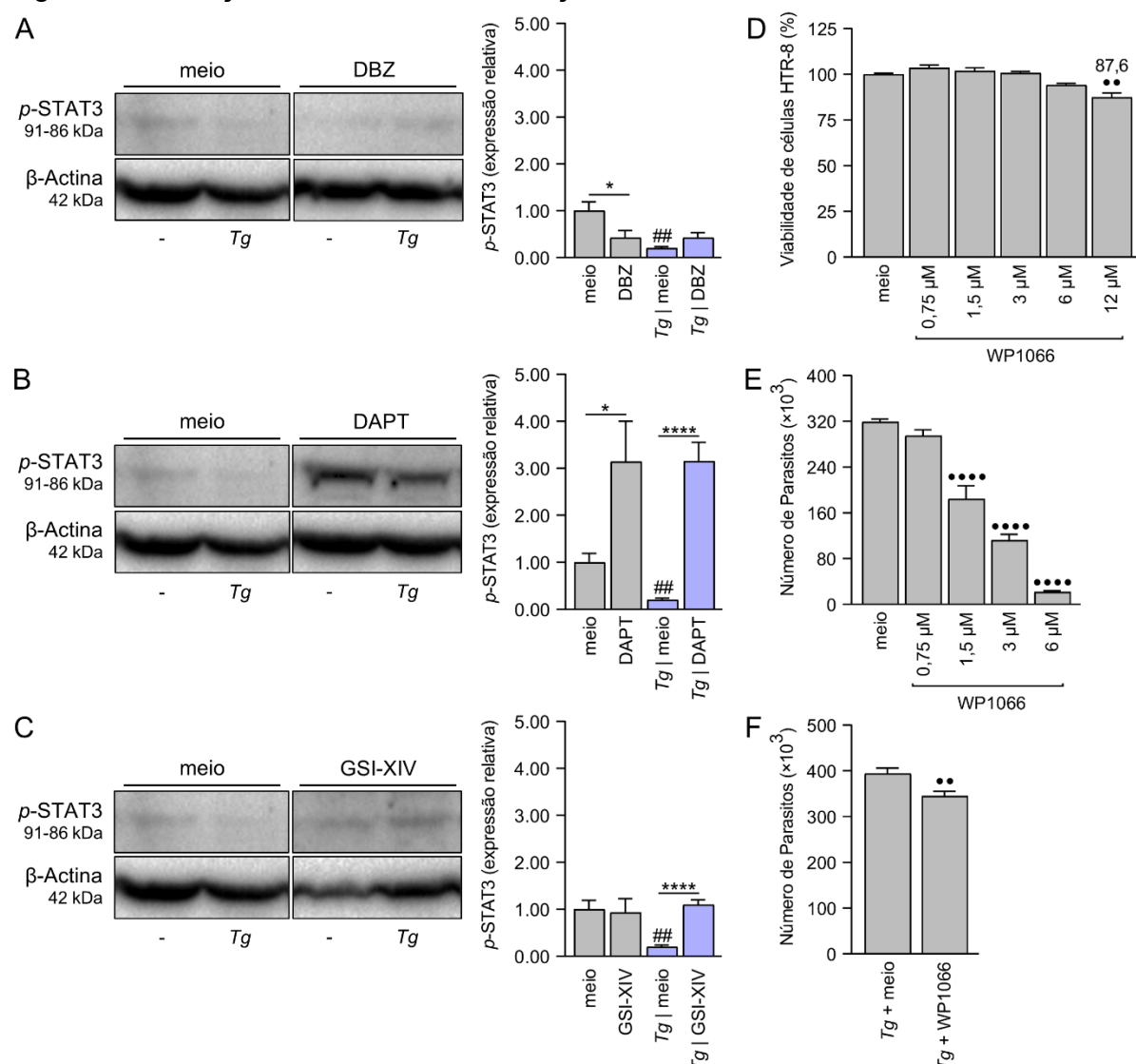


Fonte: O próprio autor. (A-C) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram infectadas, ou não, com *T. gondii*, tratadas com DBZ, DAPT ou GSI-XIV, ou não tratadas (meio), por 24 h, e os sobrenadantes de cultivo foram coletados e submetidos à detecção e quantificação de citocinas secretadas; (...): linhas pontilhadas representam os limites de detecção das citocinas mensuradas; (Tg): células infectadas com *T. gondii*; Diferenças estatísticas significativas (*#) foram determinadas por teste *t* não pareado (A-F); (#): comparação com o respectivo controle de células não infectadas; (*#): $P < 0,05$; (##): $P < 0,01$; (###): $P < 0,001$; (****): $P < 0,0001$.

5.5 A ATIVAÇÃO DE STAT3 É MODULADA FRENTE À INFECÇÃO POR *T. gondii* E À INIBIÇÃO DE GAMA-SECRETASE

Previamente, foi verificado o envolvimento de STAT3 tanto no cenário de infecção por *T. gondii* (Butcher *et al.*, 2005) quanto no eixo de sinalização Notch (Matsuno *et al.*, 2018). A partir disso, a participação de STAT3 no presente contexto foi também investigada, através da detecção e quantificação de sua fosforilação, demonstrativa de sua ativação, bem como da mensuração do parasitismo frente a sua inibição. Foi então verificado que, em ausência de tratamento com os inibidores de gama-secretase, células infectadas apresentaram redução significativa ($P=0,0021$) da expressão de STAT3 fosforilada (p -STAT3) em comparação com o respectivo controle de células não infectadas (Figura 5A-C). Já quando tratadas, em ausência de infecção, as células responderam de maneira diferencial quanto a expressão de p -STAT3, uma vez que DBZ promoveu sua redução significativa ($P=0,0480$; Figura 5A), DAPT induziu seu aumento consistente ($P=0,0347$; Figura 5B) e GSI-XIV não exerceu qualquer efeito (Figura 5C). Além disso, quando analisados os efeitos destes inibidores em células infectadas, observou-se que, embora DBZ não tenha alterado o nível de p -STAT3 em comparação com células infectadas e não tratadas (meio) (Figura 5A), aumentos significativos ($P<0,0001$) da expressão de p -STAT3 foram evidenciados em células infectadas e tratadas com DAPT (Figura 5B) ou GSI-XIV (Figura 5C). Em complementação a estes dados, o envolvimento de STAT3 no parasitismo foi também investigado, através da inibição desta proteína em células infectadas, com uso do inibidor químico WP1066. Previamente, a viabilidade celular foi verificada frente aos tratamentos com WP1066, cuja dose de 12 μ M foi a única com efetiva citotoxicidade ($P=0,0064$) em comparação com o controle não tratado (meio) (Figura 5D). A partir disso, foi observado que células infectadas e tratadas com WP1066, em doses inferiores e não tóxicas, apresentaram significativa redução ($P<0,0001$) do parasitismo frente a todas as doses de WP1066, exceto 0,75 μ M, comparadas ao controle não tratado (Figura 5E). Então, para determinar se a inibição de STAT3 poderia exercer efeito em *T. gondii* em si, as células foram infectadas com parasitos previamente tratados com WP1066 (3 μ M) e foi verificado que células infectadas com parasitos tratados também apresentaram redução significativa do parasitismo ($P=0,0058$) em comparação à infecção com parasitos não tratados (Figura 5F). Em conjunto, esses resultados demonstram efeitos diferenciais da infecção e dos inibidores de gama-secretase na ativação de STAT3, bem como elucidam seu envolvimento na proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo.

Figura 5 – Ativação de STAT3 e sua inibição em células HTR-8/SVneo.



Fonte: O próprio autor. (A-C) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram infectadas, ou não, com *T. gondii*, tratadas com DBZ, DAPT ou GSI-XIV, ou não tratadas (meio), por 24 h, e submetidas à avaliação da expressão de STAT3 fosforilada (*p*-STAT3), bem como do controle endógeno β-Actina, sendo os resultados demonstrados por bandas representativas de ambas as proteínas e dados de expressão relativa de *p*-STAT3; (D) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram tratadas com doses de WP1066, ou não tratadas (meio), por 24 h, e submetidas à avaliação de viabilidade celular, sendo os resultados expressos em porcentagem de viabilidade, com a porcentagem significativa, em relação ao controle (meio), descrita junto ao símbolo (*); (E e F) Células cultivadas por 24 h foram (E) infectadas com *T. gondii* e tratadas, ou não (meio), com doses de WP1066 por 24 h, ou, (F) foram infectadas com *T. gondii* previamente tratado com WP1066, ou não (meio), por 1 h, e cultivadas por 24 h adicionais, sendo submetidas à quantificação da proliferação de *T. gondii*, cujos resultados foram expressos em número de parasitos (×10³); (-): células não infectadas; (Tg): células infectadas com *T. gondii*; (Tg +): *T. gondii* tratado com inibidor; Diferenças estatísticas significativas (*#•) foram determinadas por teste *t* não pareado (A-C e F), por teste ANOVA com comparações múltiplas de Sidak (E) ou por teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn (D); (#): comparação com o respectivo controle de células não infectadas; (*): comparação com a condição meio; (*): *P*<0,05; (##••): *P*<0,01; (****•••): *P*<0,0001.

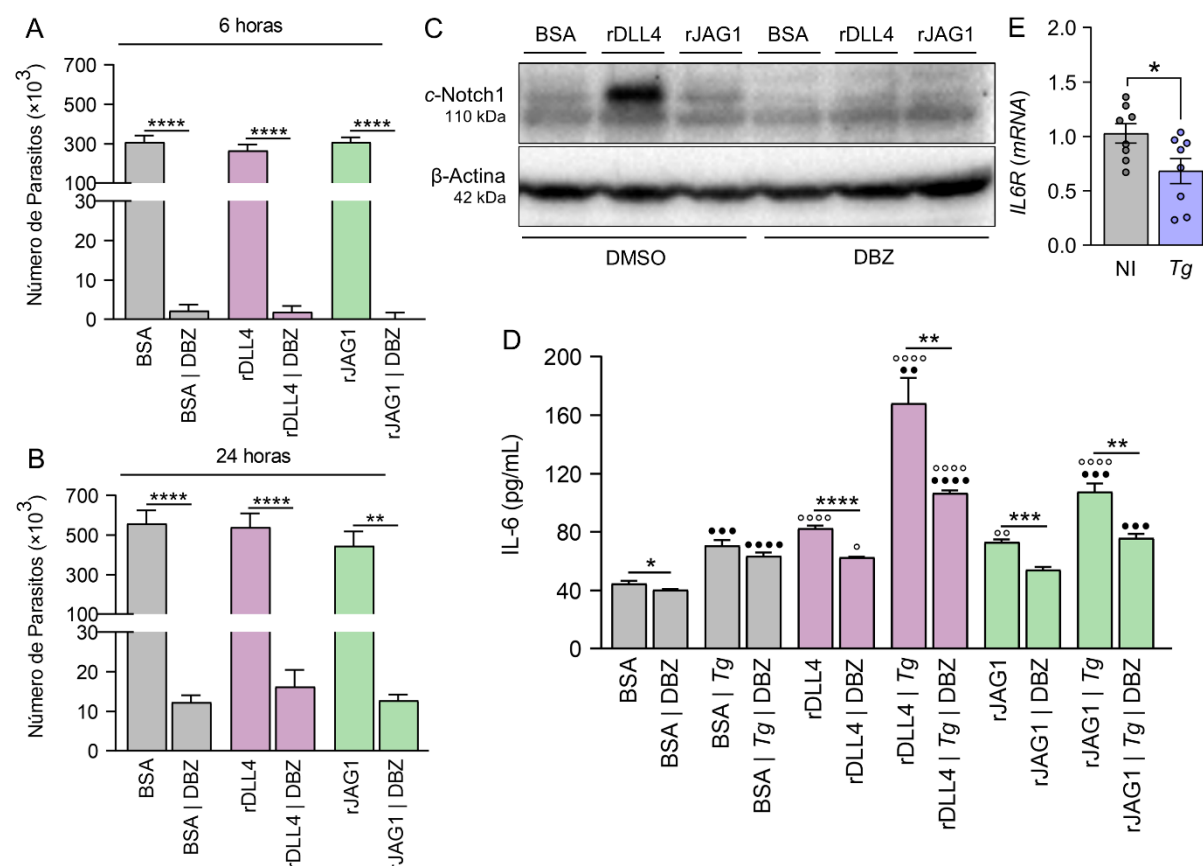
5.6 A INFECÇÃO POR *T. gondii*, LIGANTES DE NOTCH E DBZ MODULAM A SECREÇÃO DE IL-6 POR CÉLULAS HTR-8/SVneo

Buscando elucidar o mecanismo pelo qual a inibição de gama-secretase reduz a proliferação de *T. gondii*, o parasitismo foi novamente avaliado em células HTR-8/SVneo, que foram estimuladas com ligantes canônicos de Notch, rDLL4 ou rJAG1, por intervalos de 6 ou 24 h prévios à infecção. Em paralelo, as células estimuladas para Notch e, em seguida, infectadas, foram ainda tratadas com DBZ, cuja ação induziu elevada inibição parasitária em células tratadas com pouco efeito no parasito em si (Figura 2I). Os resultados obtidos demonstraram que, independentemente do tratamento com DBZ, os estímulos das células com rDLL4 ou rJAG1, por 6 (Figura 6A) ou 24 h (Figura 6B) prévias à infecção, não alteraram de forma significativa o parasitismo em relação ao controle de células não estimuladas (BSA). Por outro lado, em comparação com o controle de células não tratadas (veículo), foi observada significativa redução da proliferação de *T. gondii* frente ao tratamento com DBZ, tanto em células estimuladas com rDLL4 ($P < 0,0001$; Figura 6A e B), quanto com rJAG1 ($P < 0,0001$; Figura 6A; $P = 0,0013$; Figura 6B) ou mesmo não estimuladas ($P < 0,0001$; Figura 6A e B), independente do tempo de estimulação prévia. Para averiguar ainda se de fato rDLL4 e rJAG1 seriam capazes de ativar a sinalização mediada por Notch1, a expressão de c-Notch1 foi novamente avaliada (Figura 6C). Observou-se que células estimuladas com rDLL4, mas não com rJAG1, aumentaram a expressão de c-Notch1 em relação às células não estimuladas, sendo que tal expressão foi posteriormente atenuada por DBZ em células não estimuladas e nitidamente reduzida em células estimuladas com rDLL4. Os dados até aqui demonstram que a estimulação da sinalização Notch, ao menos por rDLL4 ou rJAG1, com ativação do receptor Notch1, ao menos por rDLL4, não alteraram o parasitismo, ao passo que a inibição de gama-secretase por DBZ exerceu novamente efetiva redução da infecção.

Assim como para STAT3, foi demonstrado que IL-6 esteve também envolvida com a atividade do eixo de sinalização Notch (Matsuno *et al.*, 2018). Além disso, foram descritas associações de IL-6 com a susceptibilidade de células trofoblásticas humanas, incluindo a linhagem HTR-8/SVneo, à infecção por *T. gondii* (Barbosa *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2021). A partir disso, verificou-se também a produção de IL-6 por células HTR-8/SVneo no contexto experimental do presente estudo (Figura 6D). Foi observado em células infectadas, tratadas, ou não, com DBZ, aumento significativo da secreção de IL-6, tanto em células estimuladas com rDLL4 ($P \leq 0,0033$), quanto com rJAG1 ($P \leq 0,0004$) ou mesmo não estimuladas (BSA) ($P \leq 0,0002$). Quando analisados os estímulos com os ligantes, verificou-se que, em comparação aos respectivos

controles não estimulados, rDLL4 induziu aumentos significativos na produção de IL-6 em todas as condições avaliadas ($P \leq 0,0123$), bem como rJAG1 induziu também maiores níveis de IL-6, embora de maneira significativa apenas nas condições isentas de DBZ ($P < 0,0011$). Além disso, quando considerado o impacto de DBZ, células de todos os grupos tratados, exceto aquelas não estimuladas e infectadas, reduziram significativamente ($P \leq 0,0422$) a produção de IL-6, quando comparadas aos respectivos controles de células não tratadas. Por fim, uma vez evidenciados esses efeitos sobre IL-6, a expressão gênica para o receptor específico desta citocina (*IL6R*) foi também avaliada (Figura 6E), cujo resultado demonstrou que a células HTR-8/SVneo reduziram significativamente ($P = 0,0332$) a expressão de *IL6R* em resposta à infecção por *T. gondii*. Em suma, os resultados acerca do envolvimento de IL-6 no presente contexto demonstram que, tanto a infecção por *T. gondii* quanto a estimulação prévia com ligantes de Notch (rDLL4 e rJAG1) induzem à regulação positiva da produção de IL-6, e que, de modo contrário, a inibição de gama-secretase por DBZ regula negativamente a produção desta citocina.

Figura 6 – Atuação de ligantes de Notch, secreção de IL-6 e expressão de *IL6R*.



Fonte: O próprio autor. (A e B) Células HTR-8/SVneo foram cultivadas por 6 ou 24 h, em placas

previamente preparadas com rDLL4, rJAG1 ou BSA (controle), infectadas com *T. gondii*, tratadas com DBZ, ou não tratadas (veículo), por 24 h, e submetidas à quantificação da proliferação de *T. gondii*, sendo os resultados expressos em número de parasitos ($\times 10^3$); (C) Células HTR-8/SVneo foram cultivadas por 24 h, em placas previamente preparadas com rDLL4, rJAG1 ou BSA (controle), tratadas com DBZ, ou não tratadas (veículo), por 24 h, e submetidas à avaliação da expressão do receptor Notch1 clivado (c-Notch1), bem como do controle endógeno β -Actina, sendo os resultados demonstrados por bandas representativas de ambas as proteínas; (D) Células HTR-8/SVneo foram cultivadas por 24 h, em placas previamente preparadas com rDLL4, rJAG1 ou BSA (controle), infectadas, ou não, com *T. gondii*, tratadas com DBZ, ou não tratadas (veículo), por 24 h, e os sobrenadantes de cultivo foram coletados e submetidos à detecção e quantificação de IL-6 secretada; (E) Células HTR-8/SVneo cultivadas por 24 h foram infectadas, ou não, com *T. gondii*, por 24 h, e submetidas à mensuração da expressão gênica de *IL6R*, sendo o resultado demonstrado como expressão de mRNA para o gene avaliado; (NI): células não infectadas; (Tg): células infectadas com *T. gondii*; Diferenças estatísticas significativas (*#°) foram determinadas por teste *t* não pareado (A, B, D e E) ou por teste ANOVA com comparações múltiplas de Sidak (D); (•): comparação com o respectivo controle de células não infectadas; (°): comparação com o respectivo controle de células não estimuladas (BSA); (*°): $P < 0,05$; (**•°°): $P < 0,01$; (**•••): $P < 0,001$; (****•••°°°°): $P < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi considerada a hipótese de que a via de sinalização celular Notch poderia influenciar na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo, um reconhecido modelo de trofoblasto extraviloso humano, à infecção por *T. gondii*, uma vez que este mecanismo de sinalização celular atua ativamente na biologia das células trofoblásticas extravilosas, as quais são exploradas por *T. gondii* como uma rota para atingir os compartimentos fetais durante sua passagem transplacentária.

Inicialmente, buscou-se verificar o efeito da infecção por *T. gondii* na expressão gênica, por células HTR-8/SVneo, de elementos envolvidos no eixo de sinalização Notch dependente de gama-secretase, os quais incluíram os receptores, ligantes canônicos e fatores reguladores responsivos à ativação da via Notch. Em resposta à infecção por *T. gondii* foi observada redução da expressão gênica para *DLL4*, cujo produto, o ligante DLL4, ao ser empregado por via exógena em estudo prévio (Luo *et al.*, 2020), demonstrou exercer efeito indutor da motilidade de células HTR-8/SVneo, regulando positivamente as habilidades migratória e invasiva protagonizadas por esta linhagem trofoblástica (Luo *et al.*, 2020). Sabe-se que além da clivagem e ativação dos receptores Notch, o complexo gama-secretase também promove a proteólise de vários substratos proteicos adicionais não pertencentes ao eixo Notch, dentre os quais se destaca a proteína APP associada à fisiopatologia da doença de Alzheimer (Andersson; Lendahl, 2014; Fortini, 2002; Kopan; Ilagan, 2004). Nesse sentido, ao ser avaliada no presente contexto, a expressão gênica para *APP* em células HTR-8/SVneo também foi reduzida de forma significativa frente a infecção por *T. gondii*, sugerindo a existência de uma relação entre o parasitismo e a atividade de gama-secretase neste modelo celular, possivelmente não restrita apenas à Notch.

Considerando que a atividade do complexo gama-secretase é essencial à ativação da sinalização Notch, buscou-se determinar, em seguida, o efeito resultante da inibição química de gama-secretase na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*. Para esta finalidade foram utilizados aqui os inibidores químicos DBZ, previamente utilizado *in vivo* no contexto da toxoplasmose aguda experimental (Briceño *et al.*, 2022) e DAPT, anteriormente utilizado *in vitro* no tratamento de células HTR-8/SVneo (Luo *et al.*, 2020; Perlman *et al.*, 2021). DBZ é um GSI quimicamente pertencente à classe das azepinas e funcionalmente classificado como isómero análogo do estado transicional de aspartil protease, que

mimetiza o estado de transição de uma clivagem de substrato por gama-secretase e se liga competitivamente ao sítio catalítico ativo das Presenilinas. DAPT, por sua vez, também pertence à classe das azepinas, no entanto atua funcionalmente como um composto não análogo do estado transicional, interagindo com gama-secretase por mecanismo distinto ao executado por DBZ (Olsauskas-Kuprys; Zlobin; Osipo, 2013). Além de DBZ e DAPT, foi utilizado também no presente estudo o inibidor GSI-XIV [z-C(tBu)IL-cho] (McLendon *et al.*, 2000).

Uma vez verificados o efeito de DBZ, DAPT e GSI-XIV na viabilidade de células HTR-8/SVneo e selecionadas doses não citotóxicas destes inibidores para dar continuidade aos ensaios, células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* foram tratadas com estes inibidores de gama-secretase e seus efeitos na proliferação do parasito foram avaliados. Foi verificado que os três diferentes inibidores empregados foram capazes de reduzir significativamente o parasitismo em células HTR-8/SVneo infectadas, sendo que DBZ e GSI-XIV apresentaram alta capacidade de inibição parasitária, ao passo que DAPT exerceu efeito menos intenso. Portanto, foi demonstrado que a proliferação de *T. gondii* em trofoblasto extraviloso humano, aqui avaliada em células HTR-8/SVneo, depende da atividade do complexo gama-secretase. Nesta perspectiva, recentemente foi investigado *in vivo* o envolvimento da sinalização Notch na toxoplasmose aguda experimental (Briceño *et al.*, 2022), sendo demonstrado que a inibição da atividade de gama-secretase por DBZ em modelo de camundongo C57BL/6 desencadeou respostas órgão-específicas frente à infecção por *T. gondii*, em que o parasitismo foi significativamente reduzido nos pulmões, mas não efetivamente controlado no fígado e intestino delgado. Por outro lado, embora não evidenciada atenuação nas cargas parasitárias hepática e intestinal, foi observado que o tratamento com DBZ promoveu uma preservação parcial da população intestinal de células caliciformes e de células de Paneth afetadas pela infecção, bem como reduziu a inflamação hepática decorrente do parasitismo (Briceño *et al.*, 2022). Reforçando também os resultados aqui obtidos, inibidores de gama-secretase têm sido efetivos contra agentes infecciosos adicionais (Hirano *et al.*, 2017), visto que YO-01027, nomenclatura sinônima a DBZ, e LY-411575, outro composto análogo a DBZ, atenuaram a replicação *in vitro*, do vírus da hepatite C (HCV), de *Plasmodium falciparum*, outro protozoário causador de complicações gestacionais (Megli; Coyne, 2022; Robbins; Bakardjiev, 2012), e, inclusive, da cepa ME-49 de *T. gondii* (Hirano *et al.*, 2017). Além disso, YO-01027 (DBZ) promoveu também o controle da infecção *in*

vivo pela cepa RH de *T. gondii* em modelo de camundongo BALB/c, onde o tratamento dos animais infectados com YO-01027 reduziu a progressão do parasitismo, bem como promoveu leve aumento da sobrevivência (Hirano *et al.*, 2017).

Interessantemente, quando avaliado o parasitismo de células HTR-8/SVneo em que parasitos em si foram previamente tratados, na tentativa de determinar se o mecanismo de ação dos inibidores de gama-secretase se restringia, ou não, exclusivamente à célula hospedeira, verificou-se que DAPT não apresentou ação direta sobre *T. gondii*, mas GSI-XIV apresentou impacto elevado sobre o parasito e DBZ demonstrou efeito inibitório sutil. Em conjunto, estes dados sugerem diferentes perfis de atuação destes inibidores de gama-secretase, de modo que DBZ e GSI-XIV possuem elevada eficiência em células infectadas, porém, enquanto GSI-XIV mantém elevada sua ação sobre *T. gondii* em si, DBZ mostra efeito reduzido no parasito. DAPT, por sua vez, demonstra eficiência pouco intensa em células infectadas e não apresenta ação sobre o parasito propriamente. A partir destas evidências é possível sugerir que GSI-XIV possui alta eficiência, mas pouca seletividade, no controle da proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo, já que atuou de forma robusta tanto na célula hospedeira, quanto no parasito em si. Por outro lado, DAPT, embora apresente menor eficiência na redução do parasitismo, possui maior seletividade nesta ação, uma vez que atuou de maneira restrita à célula hospedeira. Já DBZ, apesar de ser mais eficiente que DAPT na célula hospedeira, pode ser compreendido como menos seletivo que DAPT, uma vez que, mesmo minimamente, atuou no parasito em si. Estas especulações, ao menos quanto a DBZ e DAPT, podem ser reforçadas por estudos prévios (Hirano *et al.*, 2017; Kopan; Ilagan, 2004; Weihofen *et al.*, 2002, 2003; Wolfe; Selkoe, 2002) cujos relatos demonstram que as presenilinas do complexo gama-secretase apresentam similaridades de atuação com outra protease, a SPP, de maneira que alguns inibidores químicos de gama-secretase, como YO-01027 (sinônimo de DBZ), também inibem a atividade de SPP, por compartilharem uma estrutura conservada tipo *dibenzoazepine*. Já inibidores de gama-secretase que não possuem esta estrutura mencionada, como DAPT, não são capazes de inibir SPP como efeito adicional (Hirano *et al.*, 2017) e, devido a isso, podem ser considerados mais específicos em promover a inibição de gama-secretase. Uma vez que DBZ possui então um maior espectro de ação inibitória que DAPT, é plausível supor que esta característica tenha contribuído para a maior efetividade de DBZ em promover o controle da proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo, em relação a DAPT,

cuja ação foi de caráter mais seletivo. Neste sentido, novas abordagens experimentais se fazem necessárias para melhor compreender os mecanismos através dos quais DBZ, DAPT e GSI-XIV apresentam distintos perfis de atuação no controle da proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo.

Em continuidade, buscou-se avaliar possíveis mecanismos responsáveis pelo controle do parasitismo em células HTR-8/SVneo, promovido pela inibição de gama-secretase. Investigações prévias demonstraram os padrões de expressão dos receptores Notch e seus ligantes em tecidos placentários humanos de primeiro e terceiro trimestres gestacionais (De Falco *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 2014; Herr *et al.*, 2011). Nesta vertente, foi demonstrado também que o receptor Notch1 foi expresso especificamente por progenitores de células trofoblásticas extravilosas em placenta de primeiro trimestre gestacional, atuando como um importante regulador no desenvolvimento do trofoblasto extraviloso (Haider *et al.*, 2016), bem como foi altamente expresso por trofoblastos extravilosos proliferativos e invasivos em placenta de terceiro trimestre (De Falco *et al.*, 2007). Uma vez que células HTR-8/SVneo também expressam o receptor Notch1 (Weber *et al.*, 2013) e sua forma clivada (c-Notch1) (Perlman *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2014), a expressão de c-Notch1 foi aqui avaliada, para determinar os efeitos da infecção por *T. gondii* e dos tratamentos com DBZ, DAPT ou GSI-XIV, na ativação do receptor Notch1 em células HTR-8/SVneo.

Os resultados demonstraram que tanto a infecção por *T. gondii* quanto os tratamentos com DBZ ou DAPT provocaram significativas reduções na expressão de c-Notch1 por células HTR-8/SVneo, achados que comprovam a ação inibitória de DBZ e DAPT sobre gama-secretase, ao reduzir os níveis de c-Notch1 enquanto produto de sua atividade, e revelam que a própria infecção por *T. gondii* modula negativamente a ativação de Notch1 neste modelo celular. No entanto, como efeito inesperado quanto à inibição de gama-secretase, GSI-XIV demonstrou induzir a ativação de Notch1 em células HTR-8/SVneo, em virtude de maiores níveis de c-Notch1 observados sob tratamento com este inibidor. Além disso, observou-se que os efeitos desencadeados pelos três inibidores empregados ocorreram de maneira independente da infecção por *T. gondii*. Em conjunto, estes resultados sugerem que talvez GSI-XIV tenha tido uma ação tão potente, que foi capaz de desencadear um *feedback* positivo nas células levando à ativação de Notch1, ao contrário do esperado. Além disso, se por um lado a inibição de gama-secretase demonstrou reduzir o parasitismo em células HTR-8/SVneo, por outro, fica evidenciado que a própria ativação de Notch1 é reduzida

frente à infecção, como promovido também por DBZ e DAPT. A partir disso é plausível supor que a redução de c-Notch1 seja uma resposta da própria linhagem celular como um mecanismo protetor contra a manipulação de Notch1 por *T. gondii*, de maneira que novos experimentos, aplicando-se efeito neutralizante especificamente sobre Notch1 para bloquear sua atuação, serão necessários para comprovar esta hipótese, bem como para avaliar a real e efetiva participação da sinalização Notch, envolvendo o receptor Notch1, na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*.

Estudos prévios avaliaram extensivamente a participação de citocinas na infecção de células trofoblásticas humanas por *T. gondii*, demonstrando seus perfis de produção frente à infecção e/ou investigando seus efeitos na susceptibilidade ao parasito (Almeida *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2014, 2015; De Souza *et al.*, 2021; Guirelli *et al.*, 2015; Milian *et al.*, 2019). No contexto do presente estudo, a secreção de citocinas por células HTR-8/SVneo foi avaliada e níveis consistentes de MIF e IL-8 foram detectados com diferenças entre as condições avaliadas. Anteriormente, foi demonstrado que MIF e IL-8 estimularam a motilidade de células HTR-8/SVneo, através de aumento nos índices de migração e invasão desta linhagem celular, em resposta a estímulos com as formas exógenas destas citocinas (Jovanović *et al.*, 2010; Krivokuća *et al.*, 2015). Além disso, MIF desencadeou aumento da proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo em paralelo à produção de IL-8, efeito que caracteriza MIF como uma citocina amplificadora da susceptibilidade deste modelo celular à infecção por *T. gondii* (Milian *et al.*, 2019). Os resultados aqui obtidos demonstraram que DBZ e GSI-XIV elevaram a produção de MIF, a qual ocorreu independentemente da infecção por *T. gondii*. Além disso, DBZ e DAPT promoveram redução na secreção de IL-8, e, de modo contrário, GSI-XIV induziu aumento na produção desta citocina, todos atuando de maneira independente da infecção. Interessantemente, percebe-se que assim como estes inibidores atuaram na expressão de c-Notch1 de forma independente da presença de *T. gondii*, comportamento similar ocorreu quando consideradas a produção de MIF e IL-8. Logo, estes dados sugerem que, embora as secreções de MIF e IL-8 tenham se alterado em resposta aos inibidores de gama-secretase, os efeitos aqui observados na produção destas citocinas possivelmente não estão envolvidos nos mecanismos que levaram ao controle do parasitismo previamente evidenciado.

A via Notch pode estabelecer *crosstalk* com outras classes de sinalização celular para promover efeitos celulares variáveis (Andersson; Sandberg; Lendahl,

2011; Hansson; Lendahl; Chapman, 2004). Previamente foi demonstrado *in vitro* que a sinalização Notch, através da ativação do receptor Notch1, regulou a apoptose dependente de densidade celular em fibroblastos murinos (NIH 3T3), através da ativação coordenada do eixo de sinalização IL-6/STAT3 (Matsuno *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que, durante a infecção por *T. gondii*, IL-6 e STAT3 têm participações relevantes, uma vez que STAT3 é um fator explorado pelo parasito como uma estratégia para suprimir a resposta imune do hospedeiro (Butcher *et al.*, 2005) e IL-6, por sua vez, pode ter ação protetora, ou não, frente à infecção, a depender do cenário imunológico (Jebbari *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1997; Whitmarsh *et al.*, 2011).

A partir destes embasamentos, a participação do fator STAT3 e a produção da citocina IL-6 foram avaliadas no contexto do presente estudo. Interessantemente, foi observado aqui um efeito supressor causado pela infecção por *T. gondii* na ativação de STAT3 em células HTR-8/SVneo, fenômeno que se mostra distinto ao observado previamente em cultura de macrófagos murinos, nos quais a infecção por *T. gondii* promoveu a ativação de STAT3 (Butcher *et al.*, 2005). Além disso, DBZ e DAPT demonstraram efeitos distintos quanto à ativação de STAT3 em células HTR-8/SVneo, de forma que, enquanto DBZ reduziu a ativação de STAT3, DAPT aumentou sua ativação, sendo ambos os efeitos independentes da infecção por *T. gondii* assim como evidenciado quanto à expressão de c-Notch1 e às produções de MIF e IL-8. De forma intrigante, apesar da ativação de STAT3 ter sido suprimida em células HTR-8/SVneo infectadas, o bloqueio deste fator de sinalização com o inibidor químico WP1066 reduziu o parasitismo em células infectadas tratadas, ou mesmo quando parasitos foram tratados, de maneira que, frente a estas evidências, novas abordagens experimentais se fazem necessárias para confirmar a efetiva participação de STAT3 na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*. Apesar disso, é provável que STAT3 não esteja envolvida no controle do parasitismo evidenciado no presente estudo em resposta à inibição de gama-secretase, uma vez que os efeitos incidentes sobre STAT3 resultantes da inibição de gama-secretase, ao menos quanto à ação de DBZ e DAPT, mostraram-se independentes da infecção por *T. gondii*.

A produção de IL-6 foi também avaliada no presente contexto, e como Jagged1 participou da ativação da sinalização mediada por Notch1, requerida para a regulação da apoptose de fibroblastos murinos por IL-6 (Matsuno *et al.*, 2018), no presente estudo formas recombinantes de DLL4 e JAG1, para a estimulação da sinalização Notch em células HTR-8/SVneo, foram utilizadas em paralelo à DBZ para avaliação

do parasitismo e, sequencialmente, da produção de IL-6. Embora DBZ tenha demonstrado novamente reduzir o parasitismo, a estimulação das células com rDLL4 ou rJAG1, independentemente de DBZ, não promoveu alterações na proliferação de *T. gondii*, embora rDLL4 tenha induzido a ativação de Notch1, seguida de supressão por DBZ. A não atuação de rDLL4 e rJAG1 no parasitismo permite supor que a redução de *T. gondii* promovida pela inibição de gama-secretase ocorreu por mecanismo independente de Notch, visto que este complexo cliva outros substratos, além dos receptores Notch, com diferentes atuações celulares (Kopan; Ilagan, 2004), ou que o parasitismo seja dependente de Notch, mas pela participação de outro agente ativador, como outros ligantes canônicos ou não canônicos (Kopan; Ilagan, 2009), mas novas abordagens experimentais se fazem necessárias para comprovar estas suposições. Uma vez avaliada a produção de IL-6, tanto a infecção por *T. gondii* quanto os estímulos com rDLL4 ou rJAG1 induziram aumento na secreção desta citocina, a qual foi atenuada frente ao tratamento com DBZ, corroborando com a comprovada influência do eixo Notch/gama-secretase na modulação de IL-6 (Matsuno *et al.*, 2018). No entanto, a evidência de que a produção de IL-6 por células HTR-8/SVneo infectadas não foi alterada de forma significativa unicamente por DBZ, sugere que possivelmente a produção de IL-6 não seja o mecanismo responsável pelo controle do parasitismo evidenciado no presente estudo. Conforme o resultado aqui obtido, previamente a infecção por *T. gondii* induziu à produção de IL-6 por células HTR-8/SVneo (Guirelli *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2021), mas a redução de *IL6R* aqui evidenciada sugere a execução de novos ensaios para determinar a contribuição de IL-6/*IL6R* na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*.

Em suma, os resultados e evidências aqui apresentados demonstram a que a atividade do complexo gama-secretase é um fator determinante para a susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*, de maneira que novas abordagens experimentais são necessárias para melhor esclarecer a efetiva contribuição da sinalização Notch, aqui demonstrada parcialmente, na infecção deste modelo de trofoblasto extraviloso humano por *T. gondii*.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- Células HTR-8/SVneo, em resposta à infecção por *T. gondii*, alteram a expressão de genes relacionados à atividade de gama-secretase, reduzindo a expressão de *DLL4*, pertencente ao eixo de sinalização Notch, e de *APP*, não pertencente ao eixo Notch;
- A inibição química de gama-secretase, com doses adequadas dos inibidores DBZ, DAPT ou GSI-XIV, reduz a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo;
- A infecção por *T. gondii* promove redução da ativação do receptor Notch1, bem como da proteína de sinalização STAT3, em células HTR-8/SVneo;
- A inibição química de STAT3, com doses adequadas do inibidor WP1066, reduz a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo;
- Os inibidores de gama-secretase possuem distintos perfis de atuação na inibição parasitária, na ativação de Notch1 e de STAT3, em células HTR-8/SVneo;
- A secreção das citocinas MIF e IL-8 por células HTR-8/SVneo é modulada diferencialmente frente à infecção e aos inibidores de gama-secretase, mas não demonstra participação no controle da proliferação de *T. gondii* no presente contexto;
- A estimulação da sinalização Notch em células HTR-8/SVneo com os ligantes rDLL4 ou rJAG1 não influencia na proliferação de *T. gondii*, embora rDLL4 promova ativação de Notch1 seguida de supressão por DBZ;
- A secreção da citocina IL-6 por células HTR-8/SVneo é modulada diferencialmente frente à manipulação do eixo de sinalização Notch/gama-secretase, mas não demonstra participação no controle da proliferação de *T. gondii* no presente contexto, embora a infecção por mecanismos próprios aumente a secreção de IL-6 e reduza a expressão gênica de *IL6R*;
- Por fim, a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo depende da atividade de gama-secretase, com envolvimento da sinalização Notch, uma vez que ocorre redução da ativação de Notch1 nas células em resposta à infecção, e possibilitando o envolvimento de mecanismos independentes de Notch, visto que gama-secretase cliva substratos adicionais com variadas funções celulares e que podem também influenciar na susceptibilidade de células HTR-8/SVneo à infecção por *T. gondii*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Y. *et al.* Investigation of human trophoblast invasion *in vitro*. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 501-513, Jun. 2020. DOI <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa017>.
- ABBASI, M. *et al.* Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 188, n. 4, p. 608-616, Aug. 2003. DOI <https://doi.org/10.1086/377132>.
- ALMEIDA, M. P. O. *et al.* Susceptibility of human villous (BeWo) and extravillous (HTR-8/SVneo) trophoblast cells to *Toxoplasma gondii* infection is modulated by intracellular iron availability. **Parasitology Research**, New York, v. 118, n. 5, p. 1559-1572, May. 2019. DOI <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06257-2>.
- ALMEIDA, M. P. O. *et al.* Heme Oxygenase-1 Induction in Human BeWo Trophoblast Cells Decreases *Toxoplasma gondii* Proliferation in Association With the Upregulation of p38 MAPK Phosphorylation and IL-6 Production. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 12, 659028, Apr. 2021. DOI <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659028>.
- ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Science Immunology**, Washington DC, v. 4, n. 31, eaat6114, Jan. 2019. DOI <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>.
- ANDERSSON, E.R.; SANDBERG, R.; LENDAHL, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. **Development**, Cambridge, v. 138, n. 17, p. 3593-3612, Sep. 2011. DOI <https://doi.org/10.1242/dev.063610>.
- ANDERSSON, E. R.; LENDAHL, U. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet?. **Nature Reviews. Drug Discovery**, Berlin, v. 13, n. 5, p. 357-378, May. 2014. DOI <https://doi.org/10.1038/nrd4252>.
- APLIN, J. D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 681-692, Aug. 1991. DOI <https://doi.org/10.1242/jcs.99.4.681>.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. J. P. *Toxoplasma* Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 283-295, Apr. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.10.013>.
- ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND MD, LAKE RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. **Science**, Washington DC, v. 284, n. 5415, p. 770-776, Apr. 1999. DOI <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>.
- BARBOSA, B. F. *et al.* 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**, London, v. 35, n. 3, p. 152-162, Mar. 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>.

BARBOSA, B. F. *et al.* IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, Cary, v. 92, n. 82, p. 1-13, Mar. 2015. DOI <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>.

BISCHOF, P.; IRMINGER-FINGER, I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 1-16, Jan. 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.014>.

BORGES, M. *et al.* How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy?. **Parasite Immunology**, Hoboken, v. 41, n. 3, e12606, Mar. 2019. DOI <https://doi.org/10.1111/pim.12606>.

BRICEÑO, M. P. *et al.* Effects of Notch signaling pathway inhibition by dibenzazepine in acute experimental toxoplasmosis. **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 79, n. 101952, Dec. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101952>.

BUTCHER, B. A. *et al.* IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 174, n. 6, p. 3148-3152, Mar. 2005. DOI <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3148>.

CINDROVA-DAVIES, T.; SFERRUZZI-PERRI A. N. Human placental development and function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 131, p. 66-77, Nov. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2022.03.039>.

CUMAN, C. *et al.* Fetal-maternal communication: the role of Notch signalling in embryo implantation. **Reproduction**, Bristol, v. 147, n. 3, p. R75-R86, Feb. 2014. DOI <https://doi.org/10.1530/rep-13-0474>.

DE FALCO, M. *et al.* Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy. **Placenta**, London, v. 28, n. 2-3, p. 118-126, Feb-Mar. 2007. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.03.010>.

DE SOUZA, G. *et al.* Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. **Scientific Reports**, Berlin, v. 11, n. 12709, Jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92120-3>.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 11, n. 4, p. 569-588, Oct. 1998. DOI <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.569>.

DENKERS, E. Y. *et al.* Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-κB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. **Immunological Reviews**, Hoboken, v. 201, n. 1, p. 191-205, Oct. 2004. DOI <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00180.x>.

DIETRICH, B. *et al.* WNT and NOTCH signaling in human trophoblast development and differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 79, n. 292, p. 1-16, May. 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04285-3>.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, Jul. 1998. DOI [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00023-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00023-x).

FARAL-TELLO, P. *et al.* Modeling the human placental barrier to understand *Toxoplasma gondii*'s vertical transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 13, 1130901, Mar. 2023. DOI <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1130901>.

FIÚZA, U. M.; ARIAS, A. M. Cell and molecular biology of Notch. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 194, n. 3, p. 459-474, Sep. 2007. DOI <https://doi.org/10.1677/joe-07-0242>.

FORTINI, M. E. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 3, n. 9, p. 673-684, Sep. 2002. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm910>.

GOMES, A. O. *et al.* Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, Jun. 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>.

GRAHAM, C. H. *et al.* Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 206, n. 2, p. 204-211, Jun. 1993. DOI <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1139>.

GUDE, N. M. *et al.* Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis Research**, Oxford, v. 114, n. 5-6, p. 397-407, Nov. 2004. DOI <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>.

GUIRELLI, P. M. *et al.* Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, London, v. 36, n. 10, p. 1106-1114, Oct. 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.009>.

GUPTA, S. K. *et al.* Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, Hoboken, v. 75, n. 3, p. 361-371, Mar. 2016. DOI <https://doi.org/10.1111/aji.12436>.

HAIDER, S. *et al.* Notch signaling plays a critical role in motility and differentiation of human first-trimester cytotrophoblasts. **Endocrinology**, Washington DC, v. 155, n. 1, p. 263-274, Jan. 2014. DOI <https://doi.org/10.1210/en.2013-1455>.

HAIDER, S. *et al.* Notch1 controls development of the extravillous trophoblast lineage in the human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, Washington DC, v. 113, n. 48, p. E7710-E7719, Nov. 2016. DOI <https://doi.org/10.1073/pnas.1612335113>.

HAIDER, S.; POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. Notch signalling in placental development and gestational diseases. **Placenta**, London, v. 56, p. 65-72, Aug. 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.117>.

HAIDER, S. *et al.* Transforming growth factor- β signaling governs the differentiation program of extravillous trophoblasts in the developing human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 119, n. 28, e2120667119, Jul. 2022. DOI <https://doi.org/10.1073/pnas.2120667119>.

HANSSON, E. M.; LENDAHL, U.; CHAPMAN, G. Notch signaling in development and disease. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 14, n. 5, p. 320-328, Oct. 2004. DOI <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.04.011>.

HEEREMA-MCKENNEY, A. Defense and infection of the human placenta. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Hoboken, v. 126, n. 7, p. 570-588, Jul. 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/apm.12847>.

HENRIQUE, D.; SCHWEISGUTH, F. Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space. **Development**, Cambridge, v. 146, n. 3, dev172148, Feb. 2019. DOI <https://doi.org/10.1242/dev.172148>.

HERR, F. *et al.* Expression patterns of Notch receptors and their ligands Jagged and Delta in human placenta. **Placenta**, London, v. 32, n. 8, p. 554-563, Aug. 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.04.018>.

HIRANO, J. *et al.* Characterization of SPP inhibitors suppressing propagation of HCV and protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 114, n. 50, p. E10782-E10791, Dec. 2017. DOI <https://doi.org/10.1073/pnas.1712484114>.

HORI, K.; SEN, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 126, p. 2135-2140, May. 2013. DOI <https://doi.org/10.1242/jcs.127308>.

IO, S. *et al.* New era of trophoblast research: integrating morphological and molecular approaches. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 611-633, Sep. 2020. DOI <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa020>.

JEBBARI, H. *et al.* A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, Hoboken, v. 20, n. 5, p. 231-239, May. 1998. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x>.

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

JOVANOVIĆ, M. *et al.* Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. **Reproduction**, Bristol, v. 139, n. 4, p. 789-798, Apr. 2010. DOI <https://doi.org/10.1530/rep-09-0341>.

KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 54, n. 2-3, p. 269-280, 2010. DOI <https://doi.org/10.1387/ijdb.082769mk>.

KNÖFLER, M. *et al.* Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 76, n. 18, p. 3479-3496, Sep. 2019. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. Gamma-secretase: proteasome of the membrane?. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, Berlin, v. 5, n. 6, p. 499-504, Jun. 2004. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm1406>.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 2, p. 216-233, Apr. 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 118, n. 3, p. 212-216, Mar. 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.08.023>.

KRIVOKUĆA, M. J. *et al.* Pharmacological inhibition of MIF interferes with trophoblast cell migration and invasiveness. **Placenta**, London, v. 36, n. 2, p. 150-159, Feb. 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.003>.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, Jun. 2008. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001. DOI <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LUO, Q. *et al.* Delta-Like 4-Notch signaling regulates trophoblast migration and invasion by targeting EphrinB2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 527, n. 4, p. 915-921, Jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.032>.

MATSUNO, Y. *et al.* Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH 3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism. **European Journal of Cell Biology**, Munich, v. 97, n. 7, p. 512-522, Sep. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.09.001>.

MCLENDON, C. *et al.* Cell-free assays for gamma-secretase activity. **FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Hoboken, v. 14, n. 15, p. 2383-2386, Dec. 2000. DOI <https://doi.org/10.1096/fj.00-0286fje>.

MEGLI, C. J.; COYNE, C. B. Infections at the maternal-fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. **Nature Reviews. Microbiology**, Berlin, v. 20, n. 2, p. 67-82, Feb. 2022. DOI <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00610-y>.

MILIAN, I. C. B. *et al.* Increased *Toxoplasma gondii* Intracellular Proliferation in Human Extravillous Trophoblast Cells (HTR8/SVneo Line) Is Sequentially Triggered by MIF, ERK1/2, and COX-2. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, 852, Apr. 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00852>.

MILLER, C. M. *et al.* The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-39, Jan. 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature Reviews. Immunology**, Berlin, v. 6, n. 8, p. 584-594, Aug. 2006. DOI <https://doi.org/10.1038/nri1897>.

MOFFETT, A.; SHREEVE, N. Local immune recognition of trophoblast in early human pregnancy: controversies and questions. **Nature Reviews. Immunology**, Berlin, v. 23, n. 4, p. 222-235, Apr. 2023. DOI <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00777-2>.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, New York, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, Jun. 2004. DOI [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16412-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16412-x).

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983. DOI [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MSHEIK, H. *et al.* HTR-8/SVneo: A model for epithelial to mesenchymal transition in the human placenta. **Placenta**, London, v. 90, p. 90-97, Jan. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.12.013>.

OLIVEIRA, F. C. *et al.* ERK1/2 phosphorylation and IL-6 production are involved in the differential susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in three types of human (cyto/ syncytio/ extravillous) trophoblast cells. **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 72, n. 101544, Oct. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101544>.

OLSAUSKAS-KUPRYS, R.; ZLOBIN, A.; OSIPO, C. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. **OncoTargets and Therapy**, Auckland, v. 6, p. 943-955, Jul. 2013. DOI <https://doi.org/10.2147/ott.s33766>.

PAPUCHOVA, H.; LATOS, P. A. Transcription factor networks in trophoblast development. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 79, n. 337, p. 1-17. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04363-6>.

PASTUSCHEK, J. *et al.* Molecular characteristics of established trophoblast-derived cell lines. **Placenta**, London, v. 108, p. 122-133, May. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.02.022>.

PERLMAN, B. E. *et al.* Implications for preeclampsia: hypoxia-induced Notch promotes trophoblast migration. **Reproduction**, Bristol, v. 161, n. 6, p. 681-696, May. 2021. DOI <https://doi.org/10.1530/rep-20-0483>.

PLESSL, K. *et al.* Expression pattern and function of Notch2 in different subtypes of first trimester cytotrophoblast. **Placenta**, London, v. 36, n. 4, p. 365-371, Apr. 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.01.009>.

POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. **Placenta**, London, v. 26, p. S21-S30, Apr. 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.11.013>.

POLLHEIMER, J. *et al.* Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, 2597, Nov. 2018. DOI <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02597>.

ROBBINS, J. R. *et al.* Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 80, n. 1, p. 418-428, Jan. 2012. DOI <https://doi.org/10.1128/iai.05899-11>.

ROBBINS, J. R.; BAKARDJIEV, A. I. Pathogens and the placental fortress. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 15, n. 1, p. 36-43, Feb. 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.006>.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 25, n. 2, p. 264-296, Apr. 2012. DOI <https://doi.org/10.1128/cmr.05013-11>.

SUZUKI, Y. *et al.* Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 65, n. 6, p. 2339-2345, Jun. 1997. DOI <https://doi.org/10.1128/iai.65.6.2339-2345.1997>.

TEO, C. F. *et al.* Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington DC, v. 51, n. 2, 679-688, Feb. 2007. DOI <https://doi.org/10.1128/aac.01059-06>.

TONG, W. H. *et al.* Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. **Parasites & Vectors**, London, v. 14, n. 1, 77, Jan. 2021. DOI <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04528-x>.

TURCO, M. Y.; MOFFETT, A. Development of the human placenta. **Development**, Cambridge, v. 146, n. 22, dev163428, Nov. 2019. DOI <https://doi.org/10.1242/dev.163428>.

VELICKY, P. *et al.* Notch-dependent RBPJk inhibits proliferation of human cytotrophoblasts and their differentiation into extravillous trophoblasts. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 756-766, Aug. 2014. DOI <https://doi.org/10.1093/molehr/gau038>.

WANG, H. *et al.* Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling. **Biology of Reproduction**, Cary, v. 90, n. 78, p. 1-10, Apr. 2014. DOI <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114876>.

WEBER, M. *et al.* HTR8/SVneo cells display trophoblast progenitor cell-like characteristics indicative of self-renewal, repopulation activity, and expression of "stemness-" associated transcription factors. **BioMed Research International**, London, v. 2013, n. 243649, p. 1-10, Mar. 2013. DOI <https://doi.org/10.1155/2013/243649>.

WEIHOFEN, A. *et al.* Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. **Science**, Washington DC, v. 296, n. 5576, p. 2215-2218, Jun. 2002. DOI <https://doi.org/10.1126/science.1070925>.

WEIHOFEN, A. *et al.* Targeting presenilin-type aspartic protease signal peptide peptidase with gamma-secretase inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 278, n. 19, p. 16528-16533, May. 2003. DOI <https://doi.org/10.1074/jbc.m301372200>.

WHITMARSH, R. J. *et al.* A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 224-236, Sep. 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.009>.

WOLFE, M. S.; SELKOE, D. J. Biochemistry. Intramembrane proteases--mixing oil and water. **Science**, Washington DC, v. 296, n. 5576, p. 2156-2157, Jun. 2002. DOI <https://doi.org/10.1126/science.1073844>.

WOLFE, M. S. Structure and Function of the gamma-Secretase Complex. **Biochemistry**, Washington DC, v. 58, n. 27, p. 2953-2966, Jul. 2019. DOI <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00401>.

YAP, G. S.; SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology**, Munich, v. 201, n. 2, p. 240-247, Dec. 1999. DOI [https://doi.org/10.1016/s0171-2985\(99\)80064-3](https://doi.org/10.1016/s0171-2985(99)80064-3).

YE, W. *et al.* Adenosine A3 Receptor Mediates ERK1/2- and JNK-Dependent TNF- α Production in *Toxoplasma gondii*-Infected HTR8/SVneo Human Extravillous Trophoblast Cells. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 58, n. 4, p. 393-402, Aug. 2020. DOI <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.4.393>.

ZHU, W. *et al.* Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, 899, Apr. 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00899>.

ANEXO – COMUNICADO CEP/UFU Nº 13/2012

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