

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BEWO),
E INFECÇÃO PELA CEPA ME49 DE *TOXOPLASMA GONDII* NA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE FUNCIONAL DE MONÓCITOS HUMANOS (LINHAGEM THP-1)

MATHEUS CARVALHO BARBOSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Licenciado em Ciências Biológicas

UBERLÂNDIA – MG
JULHO/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BEWO),
E INFECÇÃO PELA CEPA ME49 DE *TOXOPLASMA GONDII* NA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE FUNCIONAL DE MONÓCITOS HUMANOS (LINHAGEM THP-1)

MATHEUS CARVALHO BARBOSA

PROFA. DRA. ELOISA AMÁLIA VIEIRA FERRO
DRA. ANDRESSA DA SILVA CASTRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Licenciado em Ciências Biológicas

UBERLÂNDIA – MG
JULHO/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BEWO),
E INFECÇÃO PELA CEPA ME49 DE *TOXOPLASMA GONDII* NA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE FUNCIONAL DE MONÓCITOS HUMANOS (LINHAGEM THP-1)

MATHEUS CARVALHO BARBOSA

PROFA. DRA. ELOISA AMÁLIA VIEIRA FERRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

PROFA. DRA. CELINE DE MELO

UBERLÂNDIA – MG
JULHO/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BEWO),
E INFECÇÃO PELA CEPA ME49 DE *TOXOPLASMA GONDII* NA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE FUNCIONAL DE MONÓCITOS HUMANOS (LINHAGEM THP-1)

MATHEUS CARVALHO BARBOSA

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia, _____ de Julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Keilah, Dirceu, Silvio e Neide**, pelo apoio incondicional, incentivo e motivação. Obrigado pela presença em vários, senão todos os momentos desta graduação. Sem dúvidas, nenhuma destas conquistas valeriam à pena, sem vocês para comemorarmos juntos. Foi fundamental o suporte e estabilidade que vocês me garantiram durante esses anos.

Aos meus irmãos, **Paula, Júlia, Giovana e Victor**, pela paciência, carinho e presença nesta caminhada. Especialmente, muito obrigado aqueles que me ouviram noites e noites, treinando diversas apresentações, decorando nomes científicos, enfim, a participação de vocês foi essencial.

Aos meus avós, **Eni, Manoelito e Anízio**, pelo carinho, dedicação e preocupação.

Ao meu padrinho e madrinhas, **Anderson, Carol e Delma**, pela motivação, atenção e carinho.

À minha prima, **Laís**, por sempre participar, apoiar e aconselhar.

À toda família, pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, **Prof^ª. Dra. Eloisa**, pelo apoio, confiança e amizade. Muito obrigado por tornar este trabalho possível e esta graduação sensacional. Você nos deu gás, desde o primeiro período, para continuar a graduação e pesquisa no laboratório.

À minha co-orientadora, **Dra. Andressa**, pelos ensinamentos, presença e carinho. Agradeço muito pelo tempo dedicado no laboratório e pela paciência ao explicar todos os questionamentos. Você foi fundamental no meu aprendizado.

À toda equipe do laboratório, **Mayara, Rafaela, Pâmela, Lara, Iliana, Bellisa, Angelica, Priscila, Fernanda, Guilherme, Caíque, Alessandra, Ana**, pelo apoio e parceria.

À Turma 78 de Ciências Biológicas, por tornar este momento tão especial. Cada um, da sua forma, fez dessa graduação uma vivência única e inesquecível.

Aos meus amigos, **Kátia, Caio, Giovana**, pelo carinho e presença, mesmo distantes e em diferentes cursos. Vocês me tornaram mais forte e possibilitaram que essa graduação começasse de uma forma mais leve e prazerosa.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, pelos desafios, carinho, apoio e ensinamentos. Vocês foram muito importantes para minha formação, além de serem exemplos que busco seguir ao longo da minha trajetória. Cada um de vocês sabe o quanto foi e é especial para mim.

Ao grupo de amigos, **Larissa, Ciro, Maisa, Alessandra, Letícia, Lucas, Lara, Guilherme, Júlia, Maristelly, Beatriz, Geovana, Bárbara**, por sempre estarem presentes, em cada momento dessa graduação. Se fosse falar de cada um de vocês, não caberia aqui. Muito obrigado pela amizade, vocês são incríveis.

A todos os amigos que, da sua forma, me auxiliaram e tornaram essa conquista possível.

RESUMO

O parasito intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*, é capaz de invadir tipos celulares de diversos animais de sangue quente. A doença causada por *T. gondii* é denominada toxoplasmose e dentre as formas de transmissão está a via transplacentária, que pode levar a casos graves de toxoplasmose congênita. O período gestacional é caracterizado pela tolerância fetal, com produção de citocinas anti-inflamatórias, por células do sistema imune, como monócitos, essencial para o sucesso gestacional. Quando a gestação ocorre em concomitância a quadros infecciosos, como a infecção por *T. gondii*, pode se estabelecer um desequilíbrio imunológico, capaz de comprometer a gestação, como a alteração no perfil de citocinas secretadas. Deste modo, o presente trabalho objetivou esclarecer e verificar a participação de células trofoblásticas na modulação da atividade de monócitos, em modelo de infecção por *T. gondii*. Para isso, células THP-1 foram submetidas a tratamento com sobrenadante de células BeWo, e infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* e foram determinados a susceptibilidade de células THP-1 ao parasito, frente ao tratamento com sobrenadantes, bem como a proliferação intracelular do parasito, e a dosagem da secreção de citocinas, por ELISA, pelos monócitos. Concluiu-se, com os resultados, que as células trofoblásticas alteram a proliferação intracelular de *T. gondii*, de forma que os resultados das secreções de citocinas se relacionam com este dado. Logo, células BeWo e *T. gondii* alteram o perfil de citocinas secretadas por células THP-1, como MIF e IL-6.

Palavras-chave: monócito, trofoblasto, *Toxoplasma gondii*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e ciclo biológico	1
1.2. Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	1
1.3. Cepas de <i>T. gondii</i>	4
1.4. Imunologia da gestação e <i>T. gondii</i> na interface materno-fetal	5
1.5. Células BeWo e THP-1	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Manutenção de células BeWo e THP-1	12
4.2. Manutenção da cepa ME49 de <i>T. gondii</i> em células BeWo e THP-1	12
4.3. Infecção de células BeWo	12
4.4. Tratamento de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo e infecção por <i>T. gondii</i>	13
4.5. Índice de infecção e proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células THP-1	13
4.6. Dosagem de citocinas (MIF, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12) em sobrenadante de células BeWo e THP-1, infectadas ou não por <i>T. gondii</i>	14
4.7. Análise Estatística	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Fatores solúveis secretados por células BeWo alteram a susceptibilidade de células THP-1 à proliferação de <i>T. gondii</i>	21
5.2. Fatores secretados por células BeWo e infecção por <i>T. gondii</i> influenciam no perfil de citocinas secretadas por células THP-1	21
5.3. Fotomicrografias de células THP-1 infectadas com <i>T. gondii</i>	23
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii* e ciclo biológico

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar diversos animais de sangue quente, incluindo o ser humano (SAREMY *et al.*, 2011). A descoberta do parasito ocorreu em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Manceaux, a partir de formas encontradas no roedor *Ctenodactylus gondi* e também no Brasil, com formas evolutivas presentes em coelhos doentes ou mortos, por Splendore. A descrição, bem como criação do gênero e espécie ocorreu em 1909, por Nicolle e Manceaux, mas apenas a partir de 1970 os estudos referentes ao parasito foram aprofundados. Neste momento já havia conhecimento acerca da distribuição geográfica do parasito, bem como das formas existentes, hospedeiros definitivos e intermediários, características epidemiológicas, ciclo de vida e alguns métodos para diagnóstico (NEVES, 2003).

Toxoplasma gondii invade a célula hospedeira de forma ativa e dependente de organelas específicas, como as micronemas, roptrias e os grânulos densos. As micronemas desempenham papel fundamental no reconhecimento, adesão e invasão do parasito às células hospedeiras (WANG & YIN, 2015). As roptrias também auxiliam na invasão do parasito, bem como regulam a manipulação de respostas inflamatórias no hospedeiro (NING *et al.*, 2015). Os grânulos densos, por sua vez, estão relacionados à manutenção do parasito no vacúolo parasitóforo, que é formado pela membrana plasmática da própria célula hospedeira, após a invasão (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; NEVES, 2003; PLATTNER; SOLDATI-FAVRE, 2008).

1.2. Ciclo biológico de *T. gondii*

O ciclo de vida completo de *T. gondii* é heteróximo, pois envolve dois hospedeiros. Felinos são os hospedeiros definitivos, nos quais ocorre a fase sexuada do ciclo, com consequente

formação dos oocistos, que serão lançados no meio ambiente junto às fezes destes animais. Aves e mamíferos, incluindo humanos, são os hospedeiros intermediários de *T. gondii* e são infectados, principalmente, por meio da ingestão de carne mal cozida contendo cistos do parasito, ou através da ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos deixados pelos felinos. Durante o ciclo de vida, o parasito passa por três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. A primeira delas tem a capacidade de se multiplicar rapidamente levando à fase aguda da toxoplasmose. Após a ação da resposta imune do hospedeiro contra o parasito, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas, os quais tendem a encistar nos tecidos destes hospedeiros, passando a se multiplicar lentamente e caracterizando a fase crônica da toxoplasmose, o que favorece sua permanência no hospedeiro (LUN *et al.*, 2015). Finalmente os esporozoítas, que são encontrados em oocistos presentes nas fezes dos felídeos e, sob condições ambientais adequadas, tornam-se maduros e infectantes no ambiente (DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A etapa sexuada do ciclo do parasito, nos hospedeiros definitivos, se inicia com a ingestão de taquizoítas, cistos contendo bradizoítas, ou ainda, oocistos presentes no meio ambiente, que penetram o epitélio intestinal dos felídeos. Uma vez no epitélio, passam por um processo de conversão para taquizoítas e iniciam intensa multiplicação por endodiogenia e merogonia, formando os merozoítos. Estes, são liberados, uma vez que as células infectadas são rompidas e penetram em novas células do tecido epitelial, transformando-se nas formas sexuadas masculinas e femininas, que quando maduras darão origem aos gametas masculinos (microgametas) e gametas femininos (macrogametas). Os microgametas deixam as células que estão e se locomovem até as células onde se encontram os macrogametas, fecundando-os. A partir da fecundação, forma-se o zigoto, que se desenvolve dentro do epitélio intestinal e passa a ser envolto por parede externa dupla, originando o oocisto (DUBEY, 2004; NEVES, 2003).

Logo após o rompimento da célula epitelial infectada, o oocisto é liberado para o meio externo, junto às fezes dos felídeos. A maturação ocorre quando em condições favoráveis de temperatura, oxigenação e umidade, processo denominado esporogonia. No intervalo de 1 a 5 dias, os oocistos passam a apresentar 2 esporocistos contendo 4 esporozoítos cada e, finalmente, tornam-se infectantes no meio ambiente (DUBEY, 2004; NEVES, 2003).

Nos hospedeiros intermediários, por sua vez, ocorre a fase assexuada do ciclo do parasito. As formas infectantes podem ser adquiridas pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais com bradizoítas; ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos; ingestão de taquizoítos em líquidos orgânicos como leite, saliva e esperma; infecção congênita; transfusão sanguínea; transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (BLADER; SAEIJ, 2009; SILVA; LANGONI, 2009). Qualquer uma destas formas infectantes, após passar pelas células do epitélio intestinal, ocorre conversão para taquizoítas e intensa multiplicação, seguidos pelo rompimento das células hospedeiras e penetração em outros tipos celulares, com a formação de vacúolos parasitóforos. Nestes vacúolos ocorrem divisões sucessivas que darão origem a novos taquizoítas, que, novamente, irão romper a célula hospedeira e infectar novas células, caracterizando a fase proliferativa do ciclo, responsável pelas manifestações agudas da doença. Os mecanismos imunológicos do hospedeiro, no entanto, atuam de forma a diminuir a quantidade de parasitos circulantes, bem como promove a transformação de taquizoítas em bradizoítas no interior de cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da doença (NEVES, 2003).

Uma vez estabelecida a infecção, a toxoplasmose se manifesta de formas diferentes. Em humanos imunocompetentes, a infecção é geralmente assintomática, uma vez que a resposta imunológica primária limita rapidamente a replicação e disseminação do parasito (DZITKO *et al.*, 2015). No entanto, pode representar risco para pacientes imunocomprometidos e ameaçar o sucesso gestacional (FORMENTI *et al.*, 2015), já que o parasito pode ser transmitido da mãe

para o feto, caracterizando a transmissão congênita, com complicações associadas ao aborto, ou ainda, ser potencialmente grave em recém-nascidos infectados congenitalmente, com consequências como natimorto, hidrocefalia ou retinocoroidite que leva à doença ocular crônica, bem como linfadenopatia, retinite ou encefalite em pessoas imunocomprometidas, devido a infecção obtida após o nascimento (HILL & DUBEY, 2002).

A ocorrência de toxoplasmose congênita se dá pela transmissão do parasito da mãe para o feto, via transplacentária, seja quando a mulher obtém a infecção durante o período gestacional (JONES *et al.*, 2001), ou no período pré-concepcional (BARBOSA *et al.*, 2007; CHEMLA *et al.*, 2002). Infecções que acometem a mãe no primeiro trimestre gestacional podem ocasionar 10% a 25% de casos de toxoplasmose congênita. Nos dois últimos trimestres, a ocorrência de infecções fetais se estende de 30% a 65%. Todavia, quanto mais tardia for a infecção, menos graves são as consequências para o feto e menores as taxas de abortos espontâneos observados em decorrência da doença (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; RORMAN *et al.*, 2006).

1.3. Cepas de *T. gondii*

A gravidade da toxoplasmose observada em modelo murino depende dos tipos de cepa do parasito, as quais apresentam diferenças genótípicas e fenotípicas, que as tornam mais ou menos agressivas (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; WUJCICKA *et al.*, 2014). Três principais tipos genéticos, predominantemente observados na América do Norte e Europa, foram descritos: cepas clonais tipo I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995).

De acordo com o seu desenvolvimento e manutenção no hospedeiro, as cepas podem ser de alta, moderada ou baixa virulência (BLADER; SAEIJ, 2009; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; MORDUE *et al.*, 2001). Cepas clonais do tipo I, como RH, são consideradas de alta virulência, pois apresentam rápida multiplicação intracelular de taquizoítas e, em camundongos, induzem uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias que podem levar

a sérios danos teciduais, capaz de comprometer a sobrevivência do hospedeiro (AJZENBERG, 2010; REY, 2001). Além disso, experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que parasitos da cepa tipo I apresentam melhor capacidade migratória através das barreiras celulares, o que contribui para sua virulência. Estão, geralmente, associadas a manifestações oculares graves da toxoplasmose (COMMODARO *et al.*, 2009; HOWE; SIBLEY, 1995; VALLOCHI *et al.*, 2005).

Cepas do tipo II, como ME49, e tipo III, como VEG, são consideradas menos virulentas, apresentando moderada e baixa virulência, respectivamente em camundongos (BLADER; SAEIJ, 2009). São caracterizadas pela multiplicação mais lenta de taquizoítas e formação rápida de cistos teciduais, levando a quadros de infecção crônica (COMMODARO *et al.*, 2009; HOWE; SIBLEY, 1995; VALLOCHI *et al.*, 2005). A cepa ME49 de *Toxoplasma gondii* é reportada como o principal tipo causador de toxoplasmose em humanos (SAREMY *et al.*, 2011).

Além das cepas clonais, foram isolados de humanos e animais, com maior diversidade na América do Sul e países africanos, outros tipos genéticos de *Toxoplasma gondii*, os quais foram denominados de cepas atípicas (ARMAND *et al.*, 2017). Elas possuem genótipos diferentes dos até então identificados e descritos, ou então apresentam uma mistura genética dos genótipos das cepas clonais (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; VILLENA *et al.*, 2004). Estão mais associadas às formas clínicas graves de toxoplasmose ocular (AJZENBERG *et al.*, 2002; BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

1.4. Imunologia da gestação e *T. gondii* na interface materno-fetal

Durante a gestação, modificações imunológicas são necessárias para a implantação embrionária e manutenção do conceito. Estas alterações ocorrem por intermédio de um processo imunomodulatório, no qual o perfil de resposta imune predominante na placenta é do tipo T helper 2 (Th2), caracterizado pela secreção de citocinas anti-inflamatórias reguladoras

(ABOU-BACAR *et al.*, 2004, VARGAS-VILLAVICENCIO; LÉON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2009).

Ainda que prevaleça uma condição anti-inflamatória, estudos apontam que o sucesso da gestação depende de um equilíbrio entre perfis de resposta pró-inflamatória (T helper 1 – Th1) e anti-inflamatória (Th2). O início do período gestacional é caracterizado por um perfil imune predominantemente pró-inflamatório, fundamental para o processo de invasão do trofoblasto e implantação do blastocisto no endométrio (NARUSE, 2010). Já no segundo trimestre da gestação, observa-se maior influência do perfil imune do tipo Th2 e de células T reguladoras, que asseguram a tolerância fetal (PICCINNI *et al.*, 2016). Por fim, aproximando-se do final do último trimestre gestacional, tem-se, novamente, o estabelecimento de um perfil de resposta imune do tipo pró-inflamatória que viabilizará o parto, por intermédio da infiltração de células do sistema imune na interface materno-fetal, as quais induzirão a contração seguida da expulsão do feto (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

Esta alternância imunológica que ocorre no organismo materno durante a gestação, se dá, principalmente, por ação das células presentes na interface materno-fetal. Dessa forma, células do sistema imune inato e adaptativo assumem papel importante durante a implantação e manutenção do conceito (MICHELON *et al.*, 2006). Monócitos são uma das primeiras células presentes no sítio de implantação, representando uma das populações de leucócitos predominante neste microambiente e são fundamentais na homeostase tecidual. A quantidade dessas células imunes inatas aumenta ao longo da gestação (HANNA *et al.*, 2006; KOGA; ALDO; MOR, 2009) e isto se dá, principalmente, pela ação das células trofoblásticas, que secretam citocinas e quimiocinas capazes de modular a migração e diferenciação de monócitos na interface materno-fetal. Deste modo, estes monócitos apresentam um perfil de resposta imune diferente daqueles que não tiveram contato anterior com trofoblasto, podendo secretar tipos e quantidades diferentes de citocinas, além de tornarem-se mais ou menos susceptíveis a

infecções por patógenos (CASTRO *et al.*, 2013; FEST *et al.*, 2007; KOGA; ALDO; MOR, 2009). Células *Natural Killer* (NK) também desenvolvem papel fundamental no período gestacional, uma vez que estão relacionadas com a invasão do trofoblasto no endométrio e formação de vasos sanguíneos, concentrando-se próximas às artérias espiraladas (ZHANG *et al.*, 2015).

Células da imunidade adaptativa, principalmente células T reguladoras, também são de fundamental importância para o sucesso gestacional. Estudos demonstram que complicações gestacionais graves podem estar associadas a distúrbios na quantidade de células T reguladoras presentes na interface materno-fetal, uma vez que, em pacientes que sofreram abortos espontâneos, o número de células T reguladoras presentes na decídua era menor do que em pacientes em que a gestação cursou de forma normal (RANGO, 2008).

Em contrapartida, este estado predominantemente anti-inflamatório, necessário à manutenção da gestação, faz com que o organismo materno se torne um microambiente imunologicamente privilegiado para o estabelecimento e desenvolvimento de patógenos (REMYINGTON *et al.*, 2001; SYKES *et al.*, 2012). Dessa forma, quando a gestação ocorre concomitante a algum tipo de infecção, pode-se estabelecer um desequilíbrio imunológico, capaz de gerar problemas na gestação ou, até mesmo, interrompê-la (LUPPI, 2003; YIN *et al.*, 2014).

Este evento é observado em casos de infecções com *T. gondii*, pois a presença do parasito na interface materno-fetal induz a uma resposta tipicamente celular e pró-inflamatória, com secreção de citocinas do perfil de resposta imune Th1, como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), responsáveis pela resposta imune efetora contra *Toxoplasma gondii*. A tolerância fetal, por sua vez, é mantida por uma resposta predominantemente anti-inflamatória, com secreção de citocinas do perfil de resposta imune

Th2 (LOPES *et al.*, 2007) e citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β 1 (fator transformador de crescimento).

Desta forma, o sucesso gestacional depende, diretamente, da secreção equilibrada de citocinas pró e anti-inflamatórias e das relações estabelecidas entre células trofoblásticas e células do sistema imune materno presentes na interface materno-fetal. Sendo assim, qualquer interferência nestes mecanismos, como a infecção por *T. gondii*, pode comprometer ou impedir esta gestação (CHANNON; SEGUIN; KASPER, 2000; UNNO; KITO; TAKASHIMA, 2010).

1.5. Células BeWo e THP-1

O trofoblasto humano desempenha papel fundamental para a garantia da gestação, uma vez que impossibilita a rejeição materna por diversos mecanismos (WEGMANN *et al.*, 1993). Deste modo, estudos *in vitro* que utilizam linhagens celulares pré-estabelecidas, possibilitam a melhor compreensão da função do trofoblasto na imunologia da gestação (BARBOSA, 2007). Dentre os papéis desempenhados pelo trofoblasto, tem-se a adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, regulação hormonal, nutrição do embrião e formação da porção fetal da placenta (FERRO, 2000)

Células BeWo foram isoladas em 1968 por Pattillo e Gey, a partir de um coriocarcinoma humano. Foram as primeiras células trofoblásticas endócrinas humanas a serem cultivadas em cultura e são um modelo amplamente usado para células trofoblásticas humanas, as quais não se diferenciam em sincício e crescem rapidamente em cultura (BARBOSA, 2007; LIU *et al.*, 2016). Além de produzirem laminina 10 (CHURCH & APLIN, 1998), também expressam receptores de membrana comuns ao trofoblasto, bem como secretam citocinas e hormônios, como gonadotrofina e lactogênio (FUJISAWA *et al.*, 2000).

Células THP-1 designam uma linhagem celular de monócitos imortalizados, derivadas do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Segundo estudos, representam boa ferramenta para investigar a estrutura e função do monócito, seja em quadros infecciosos ou não (BOSSHART & HEINZELMANN, 2016; TSUCHIYA *et al.*, 1980).

Deste modo, ambas linhagens celulares possibilitam avaliar, em estudos *in vitro*, as interações entre células trofoblásticas e monócitos, além de serem susceptíveis à infecção por *T. gondii*, sendo, portanto, bons modelos de estudo deste parasito.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos já demonstraram que células trofoblásticas são capazes de modular as atividades funcionais de alguns tipos celulares, e que isto pode interferir nos mecanismos de tolerância fetal e combate a patógenos. Sabendo-se que os monócitos contribuem com a disseminação de *Toxoplasma gondii* na interface materno-fetal, o trabalho em questão justifica-se pela possibilidade de avaliar se e como células trofoblásticas podem modular as atividades funcionais de monócitos, frente à infecção pela cepa ME49 de *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a participação de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo), na modulação da atividade funcional de monócitos humanos (linhagem THP-1), como um modelo experimental de infecção por *Toxoplasma gondii* na interface materno-fetal.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o índice de infecção pela cepa ME49 de *T. gondii* em células THP-1, após tratamento com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não com *T. gondii*;
- Avaliar a proliferação de *T. gondii* em células THP-1 tratadas ou não com sobrenadante de células BeWo (infectadas ou não infectadas por *T. gondii*);
- Determinar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por células THP-1 infectadas ou não por cepa ME49 de *T. gondii*;
- Determinar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por células THP-1 submetidas ao tratamento com sobrenadante de cultura de células BeWo (infectadas ou não infectadas por *T. gondii*) e posteriormente infectadas ou não com cepa ME49 de *T. gondii*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção de células BeWo e THP-1

Células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) e monócitos humanos (linhagem THP-1) adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC) foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75cm² (Ciencor Scientific) contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Chemical) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e 1% de antibióticos (10,000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (BARBOSA *et al.*, 2008).

4.2. Manutenção da cepa ME49 de *T. gondii* em células BeWo e THP-1

Os taquizoítas da cepa ME49 de *T. gondii* foram mantidos em células BeWo cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino e mantidos em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após a lise da maioria das células infectadas, o meio contendo taquizoítas livres foi centrifugado a 400 x g por 5 minutos e os parasitos ressuspensos em meio a 2% de soro foram distribuídos em novos frascos com células não infectadas.

4.3. Infecção de células BeWo

Células BeWo foram retiradas de frascos de cultura, centrifugadas, contadas na câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 1×10^5 células por 500 µl de meio de cultura/poço e, posteriormente, plaqueadas em placas de 24. Estas células foram infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* na proporção de 3 parasitos/ 1 célula. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -80° C para posterior tratamento de

monócitos (linhagem THP-1). O sobrenadante de células BeWo não infectadas foi utilizado como controle.

4.4. Tratamento de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo e infecção por *T. gondii*

Células THP-1 foram plaqueadas a concentração de 1×10^5 células/ 500µl em placas de 24 poços e tratadas com sobrenadantes de cultura de células BeWo na proporção de 4:1 de meio de cultura suplementado com 10% de SFB (infectadas ou não pela cepa ME49 de *T. gondii*), e, após 24 horas de tratamento, células THP-1 foram infectadas ou não com a cepa ME49 de *T. gondii*. As células foram tratadas por um período de 24 horas, e, posteriormente, os sobrenadantes das células BeWo foram retirados e meio completo foi adicionado aos poços, por mais 24 horas. Finalmente, o meio completo foi retirado e adicionou-se aos poços meio contendo parasitos (3 parasitos:1 célula). Nas condições controle, adicionou-se apenas meio completo, sem parasitos. Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes de células THP-1 foram coletados e congelados a -80°C , para posterior dosagem de citocinas. As células foram utilizadas nos experimentos para determinar índice de células infectadas e proliferação intracelular de *T. gondii*.

4.5. Índice de infecção e proliferação intracelular de *T. gondii* em células THP-1

Para avaliar o índice de infecção e proliferação intracelular do parasito, a quantidade de células THP-1 infectadas e o número de parasitos intracelulares foram quantificados. Dessa forma, as células THP-1 infectadas obtidas do experimento 4.4 foram utilizadas para montagem de lâminas com esfregaços. Para isso, em cada extremidade da lâmina foram colocados 30 µl de solução contendo células THP-1 infectadas (controle ou com seus respectivos tratamentos). Após secagem, foram fixadas em formol 10% em *phosphate buffered saline* (PBS) e coradas com azul de toluidina 1% por 10 segundos. Como controle, foram utilizadas células THP-1 não

tratadas com sobrenadante de células BeWo, porém infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii*. As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz e as células foram quantificadas quanto à percentagem de células infectadas a cada 200 células examinadas (índice de infecção) e quanto ao número total de parasitos intracelulares observados nas 200 células examinadas (proliferação intracelular do parasito).

4.6. Dosagem de citocinas (MIF, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12) em sobrenadante de células BeWo e THP-1, infectadas ou não por *T. gondii*

A secreção de citocinas por células THP-1 foi mensurada por ELISA sanduíche, conforme descrição do fabricante. Previamente, as placas de poliestireno com 96 poços de alta afinidade foram incubadas com os respectivos anticorpos de captura humanos (Fator de inibição da migração de macrófagos – MIF, fator de necrose tumoral-alfa – TNF- α , interleucina-6 – IL-6, IL-10, IL-12) (BD Biosciences e RD system) por 18 horas à temperatura ambiente (MIF) ou na geladeira, à 4° C (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12). Uma vez realizada lavagem com PBS-Tween 20 a 0,05% e bloqueio com PBS e soroalbumina bovina (SBA) (Sigma Chemical Co.) a 1%, foram adicionadas as amostras e a respectiva curva padrão. Após o intervalo de incubação, novas lavagens com PBS Tween foram realizadas e as placas foram incubadas com os anticorpos secundários (detecção) correspondentes. Após ciclos de lavagens, as placas foram incubadas com streptavidina acoplada a peroxidase, durante 20 minutos. Logo após último ciclo de lavagem, foi adicionado o 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Polyscience) e as placas foram incubadas por 30 minutos. A interrupção da reação foi determinada com a adição de solução de ácido sulfúrico 2N. Os imunocomplexos foram quantificados quanto à densidade óptica em leitor de microplacas a 450 nm e a concentração de citocinas, determinada com base em curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas das citocinas recombinantes. Os valores da densidade óptica foram convertidos em pg/mL, segundo a curva padrão, por intermédio do software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA).

4.7. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prim, versão 5.0, sendo dados não pareados analisados pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Estas diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

Figura 1

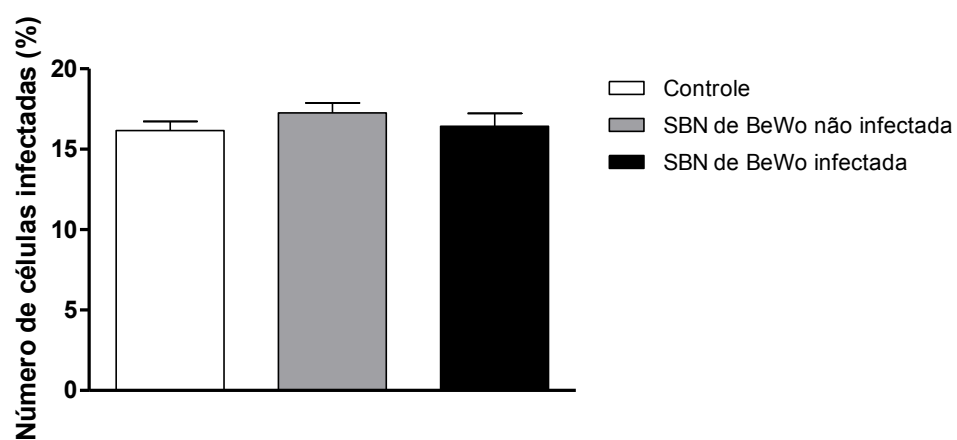


Figura 1. Número de células THP-1 infectadas (%) após estímulo com sobrenadante (SBN) de células BeWo, infectadas ou não por *T. gondii*. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (One-way ANOVA).

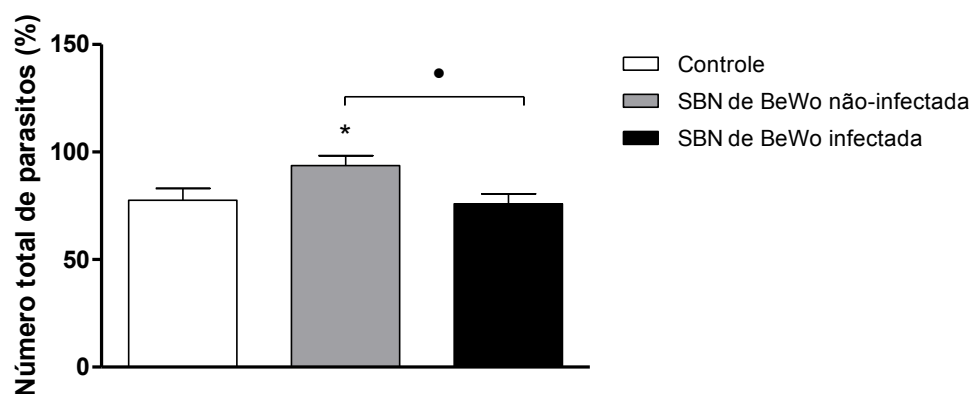
Figura 2

Figura 2. Número total de parasitos em células THP-1 estimuladas com sobrenadante (SBN) de células BeWo, infectadas ou não por *T. gondii*. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (One-way ANOVA). (*) Células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, comparadas ao controle (células THP-1 não estimuladas e infectadas); (•) células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas comparadas às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas.

Figura 3

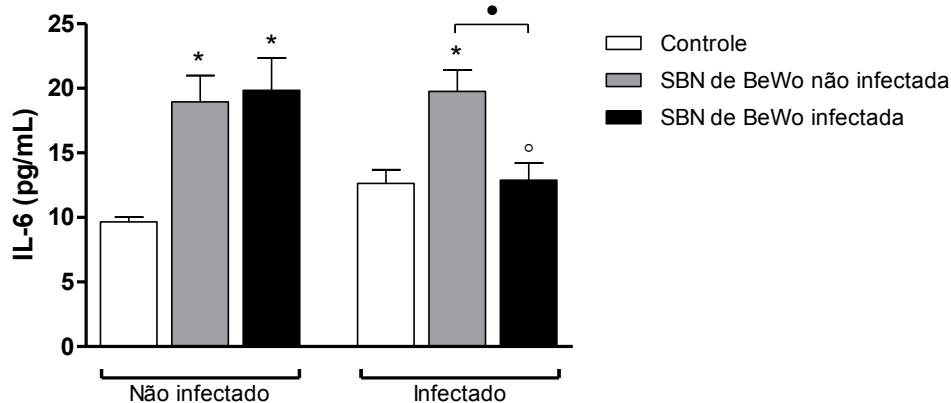


Figura 3. Secreção de IL-6 por células THP-1 não infectadas e infectadas com *T. gondii*. Os resultados estão expressos em pg/ml e a dosagem da citocina foi realizada por ELISA. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (One-way ANOVA). (*) Células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, comparadas aos controles (células THP-1 não estimuladas e infectadas ou não por *T. gondii*); (•) células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas comparadas às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas; (o) células THP-1 infectadas, estimuladas ou não com sobrenadante de células BeWo comparadas às células THP-1 não infectadas, estimuladas ou não com sobrenadante de células BeWo.

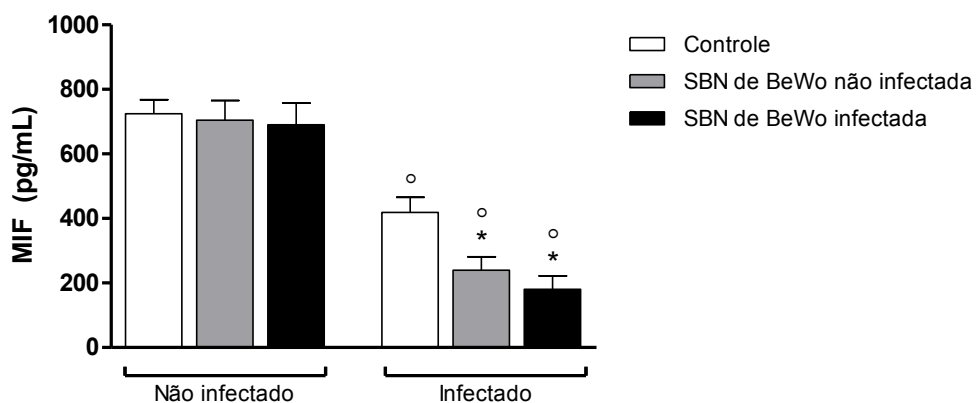
Figura 4

Figura 4. Secreção de MIF por células THP-1 não infectadas e infectadas com *T. gondii*. Os resultados estão expressos em pg/ml e a dosagem da citocina foi realizada por ELISA. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (One-way ANOVA). (*) Células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, comparadas aos controles (células THP-1 não estimuladas e infectadas ou não por *T. gondii*); (o) células THP-1 infectadas, estimuladas ou não com sobrenadante de células BeWo, comparadas às células THP-1 não infectadas, estimuladas ou não com sobrenadante de células BeWo.

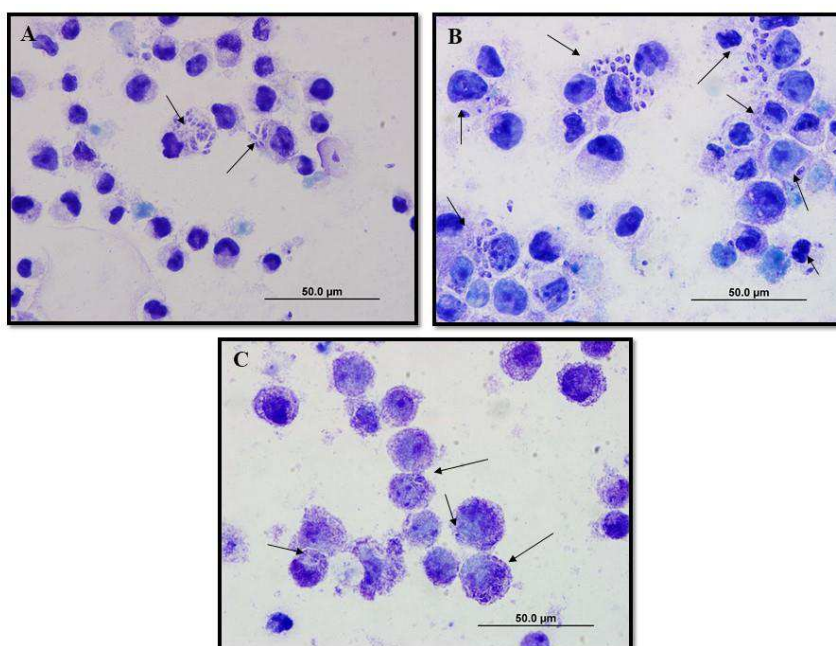
Figura 5

Figura 5. Fotomicrografias de células THP-1 infectadas com *T. gondii*. As células foram fixadas e coradas com azul de toluidina. **(A)** Controle de células THP-1 infectadas. **(B)** Células THP-1 infectadas e estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas. **(C)** Células THP-1 infectadas e estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas. As setas evidenciam a presença de *Toxoplasma gondii* no citoplasma das células THP-1.

5.1. Fatores solúveis secretados por células BeWo alteram a susceptibilidade de células THP-1 à proliferação de *T. gondii*

Com objetivo de avaliar se células BeWo seriam capazes de modular as atividades funcionais de monócitos, diante da infecção pela cepa ME49 de *T. gondii*, foram realizados experimentos para verificar se uma destas funções moduladas estaria relacionada à susceptibilidade de células THP-1, bem como sua maior ou menor susceptibilidade à proliferação do parasito (Figuras 1 e 2).

Os resultados referentes à Figura 1 demonstraram que o número de células THP-1 infectadas não foi estatisticamente diferente entre nenhuma das condições analisadas. No entanto, o número total de parasitos, em 200 células contadas, foi maior em células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas, comparadas ao controle ou às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas (Figura 2).

5.2. Fatores secretados por células BeWo e infecção por *T. gondii* influenciam no perfil de citocinas secretadas por células THP-1

Outro fator avaliado para verificar se células BeWo poderiam modular a atividade funcional de células THP-1, diante da infecção pela cepa ME49 de *T. gondii*, foi a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias por células THP-1 (Figuras 3 e 4).

Quanto à secreção de IL-6, observou-se que células THP-1 estimuladas com os diferentes sobrenadantes de células BeWo secretaram mais IL-6 quando comparadas ao controle. Além disso, neste grupo, não houve diferença estatística significativa entre células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas e àquelas estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas (Figura 3).

Já no grupo de células THP-1 infectadas, observou-se diferença estatística significativa entre o controle e células THP-1 estimuladas com o sobrenadante de células BeWo não infectadas, sendo que, células THP-1 estimuladas secretaram mais IL-6 do que células THP-1

não estimuladas. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre o controle e células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas. Além disso, células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas secretaram níveis mais elevados de IL-6 quando comparadas àquelas que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas (Figura 3).

Quando comparadas às condições experimentais entre os grupos de células THP-1 infectadas e não infectadas, verificou-se diferença estatística significativa apenas entre células THP-1 que foram estimuladas com o sobrenadante de células BeWo infectadas, sendo que, frente a este estímulo, células THP-1 não infectadas secretaram mais IL-6 do que células THP-1 infectadas (Figura 3).

A Figura 4, apresenta a secreção de MIF, em que foi possível observar que no grupo de células THP-1 não infectadas, a secreção desta citocina foi semelhante em todas as condições, não havendo diferença estatística significativa entre nenhuma das condições avaliadas. Entretanto, no grupo de células THP-1 infectadas, constatou-se menor secreção de MIF nas condições em que as células foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, quando comparadas ao controle. Não houve diferença estatística significativa entre células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas e células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas (Figura 4).

Quando comparados o grupo de células THP-1 infectadas e não infectadas, verificou-se que em todas as condições analisadas, células THP-1 infectadas secretaram menor quantidade de MIF quando comparadas aos seus respectivos controles não infectados (Figura 4).

As citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 também foram mensuradas no sobrenadante de células THP-1, porém, as suas secreções foram inferiores ao limite de detecção (dados não mostrados).

5.3. Fotomicrografias de células THP-1 infectadas com *T. gondii*

As fotomicrografias ilustram os resultados obtidos quanto à proliferação intracelular de *T. gondii* em células THP-1 (Figura 5). Como observado na Figura 2, a proliferação do parasito apresentou-se maior na condição em que células THP-1 infectadas e previamente estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas (Figura 5).

6. DISCUSSÃO

O período gestacional requer um estado imunológico diferenciado, em que predomina uma resposta imune de perfil T helper 2 (Th2), com secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13, necessárias para assegurar a manutenção do feto (MOSMANN & SAD, 1996; SYKES *et al.*, 2012). No entanto, a presença de patógenos, como *T. gondii*, na interface materno-fetal, pode alterar este estado tolerogênico, induzindo à secreção de citocinas pró-inflamatórias do perfil T helper 1 (Th1), como IL-12 e TNF- α , que podem comprometer o sucesso gestacional (ROBINSON & KLEIN, 2013).

As células trofoblásticas, além de fundamentais na manutenção da gestação, podem sinalizar e modificar a atividade de monócitos na placenta, principalmente em situações que envolvem infecções, uma vez que elas expressam receptores de reconhecimento padrão. Desta forma, estes receptores atuam na localização e identificação de patógenos, como bactérias, vírus e protozoários, como *T. gondii*, desencadeando a secreção de citocinas, como IL-8, IL-6, TGF- β , que atuam sobre as células do sistema imune presentes no microambiente placentário, alterando as atividades funcionais destas células (ABRAHAMS *et al.*, 2005; COSTELLO; JOYCE; ABRAHAMS, 2007).

Alguns estudos demonstraram a interação entre monócitos (linhagem THP-1) e células trofoblásticas (linhagem BeWo), por meio da atividade migratória destes monócitos em direção à decídua. Nestes estudos, demonstrou-se que esta migração foi induzida, principalmente, pela liberação de quimiocinas secretadas pelo trofoblasto, como IL-8 e MCP-1 (FEST *et al.*, 2007), além da presença do trofoblasto, também alterar a produção de citocinas secretadas pelos monócitos, tanto na presença quanto ausência de *Toxoplasma gondii* (CASTRO, 2012)

Outros estudos demonstraram que células trofoblásticas apresentam funções imunológicas, uma vez que respondem a ligantes bacterianos e virais, além de secretarem fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, tais como IL-8, IL-6 e TGF- β (ALDO *et al.*, 2014;

ABRAHAMS *et al.*, 2008; ABRAHAMS; ROMERO; MOR, 2005; ABRAHAMS *et al.*, 2004; GONZALES, *et al.*, 2007; HIRSCHFELD *et al.*, 2007). A partir destes resultados, acredita-se que células trofoblásticas são capazes de regular a migração, diferenciação e função dos monócitos presentes na decídua, conferindo a eles um fenótipo adequado para manutenção da gestação (ALDO *et al.*, 2014; FEST *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados obtidos quanto a infectividade de células THP-1 e proliferação parasitária intracelular, percebe-se que, apesar da porcentagem do número de células infectadas não apresentar diferença significativa entre as condições analisadas, verificou-se maior proliferação do parasito na condição que células THP-1 foram tratadas com sobrenadante de células BeWo não infectadas. Ao comparar os resultados da secreção de citocinas nas condições infectadas com aqueles referentes à proliferação do parasito, observou-se que na condição em que houve maior proliferação parasitária, também houve maior secreção de IL-6.

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica, ou seja, pode atuar sobre vários tipos celulares diferentes. Geralmente é produzida em sítios locais de tecidos e liberada na circulação, principalmente em casos de perturbação da homeostase, como endotoxemia, infecções agudas e traumas (KISHIMOTO; AKIRA; TAGA, 1992; XING *et al.*, 1998; ZITNIK & ELIAS, 1993). Além disso, é conhecida por desempenhar papel fundamental na resposta imune contra infecções intracelulares crônicas, juntamente a outras citocinas, como IL-1 e TNF- α , induzindo reações típicas de fase aguda, como febre, liberação de corticosterona e produção de proteínas de fase aguda no fígado (BAUMANN & GAULDIE, 1994; XING *et al.*, 1998).

No período gestacional, IL-6 desempenha papel fundamental na regulação das produções de hCG (gonadotrofina coriônica humana) e hPL (hormônio lactogênico placentário) (STEPHANOU; HANDWERGER, 1994), bem como na implantação e invasão do blastocisto, crescimento fetal, pelo controle da taxa de transferência de nutrientes e gases, e permeabilidade vascular (DESAI *et al.*, 2002; JONES; JANSSON; POWELL, 2009; KENDALL, PEEBLES,

2005; ROBERTSON; O'CONNELL; RAMSEY, 2000). Dessa forma, por exercer uma função primordial no processo gestacional, pode-se sugerir que a maior secreção de IL-6 por células THP-1 que foram tratadas com sobrenadante de células BeWo, está associada a uma possível modulação exercida pelas próprias células BeWo, que induzem essa secreção aumentada da citocina, pelos monócitos presentes na interface materno-fetal, elevando, desta forma, a quantidade desta citocina no microambiente placentário, favorecendo, portanto, os mecanismos desempenhados por esta citocina.

Apesar de apresentar características tipicamente pró-inflamatórias, estudos em camundongos demonstraram que animais geneticamente deficientes para essa citocina (IL-6^{-/-}), não foram capazes de controlar uma resposta pulmonar neutrofílica aguda, pelo contrário, ocorreu uma resposta pró-inflamatória ainda mais intensa, que resultou em elevada neutrofilia. Este fato sugere um papel regulador da IL-6 endógena em respostas inflamatórias agudas locais. Além disto, camundongos IL-6^{-/-} apresentaram índice de mortalidade maior do que camundongos selvagens desafiados com dose letal de endotoxina. Outros estudos também demonstram que a ausência de IL-6 resulta em maiores níveis de secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , em casos de estímulo com endotoxina (BUNDSCHUH *et al.*, 1997; MANTHEY & VOGEL, 1992; STANDIFORD *et al.*, 1995; XING *et al.*, 1998).

Há também, estudos que mostraram que a ausência de IL-6 pouco afeta os níveis de IL-10 e TGF- β , seja localmente no pulmão, durante inflamação pulmonar aguda ou sistematicamente na circulação, durante endotoxemia, sugerindo que uma das funções da IL-6 durante respostas tipicamente agudas é a supressão dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, sem comprometer os níveis de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, sugerem que as funções anti-inflamatórias desempenhadas pela interleucina-6 não podem ser compensadas por outras citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (XING *et al.*, 1998). Outros trabalhos descritos na literatura, demonstram que a presença de IL-6 pode resultar na redução do crescimento de células

cancerígenas em casos de leucemia linfocítica crônica induzida por TNF (ADERKA *et al.*, 1993; WONG *et al.*, 2003), além de suprimir a produção de IL-1 β e TNF, induzida por LPS e fitohemaglutinina, em células mononucleares humanas (SCHINDLER *et al.*, 1980; WONG *et al.*, 2003).

Baseado neste trabalho, os resultados obtidos mostram que IL-6 parece desempenhar uma função anti-inflamatória, já que a carga parasitária é mais elevada na condição em que há maior secreção de IL-6. Interessantemente, outros trabalhos, também envolvendo a interação entre monócitos e células trofoblásticas na presença de *T. gondii*, demonstraram que IL-6 assumiu uma função pró-inflamatória (CASTRO *et al.*, 2013). Entretanto, estes trabalhos foram realizados com a cepa RH de *T. gondii*, enquanto que, no estudo aqui apresentado, utilizou-se a cepa pouco virulenta de *T. gondii*, ME49. Estas evidências demonstram, claramente, que tanto os fatores solúveis presentes em um microambiente, quanto a cepa do parasito são determinantes para o tipo de resposta imune que será gerada. No modelo experimental proposto neste estudo, há indícios de que os fatores solúveis secretados por células BeWo não infectadas e a posterior infecção com a cepa ME49 de *T. gondii* desencadeiam a atividade anti-inflamatória de IL-6.

MIF, identificado como fator solúvel capaz de inibir a migração de macrófagos em cultura de linfócitos T ativos, é uma proteína que exibe a combinação das propriedades de hormônio, citocina e tiorredoxina, fundamental na regulação de respostas imunes e inflamatórias (BLOOM & SHEVACH, 2003; CALANDRA & ROGER, 2003). Diversos tipos celulares apresentam expressão e secreção de MIF, incluindo linfócitos T, monócitos, macrófagos, células endoteliais, eosinófilos, neutrófilos polimorfonucleares, células epiteliais, células musculares lisas, fibroblastos sinoviais e células da hipófise anterior (BERNHAGEN *et al.*, 1993; CALANDRA *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2004; DARYADEL *et al.*, 2006; IMAMURA *et al.*, 1996; LEECH *et al.*, 1999; NISHIHARA; KOYAMA; MIZUE, 1998; ROSSI *et al.*, 1998).

Deste modo, a natureza pleiotrópica desta citocina possibilita sua participação em diversos mecanismos, como na ativação de via de sinalização de MAP (proteína-quinases ativadas por mitógenos) quinases, aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios e inibição de apoptose (CALANDRA & ROGER, 2003; MITCHELL *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 1999). Uma vez responsável pela regulação da secreção de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-1 e TNF- α , está associada a diversas disfunções inflamatórias, como diabetes, artrite reumatoide, choque séptico, colite e glomerulonefrite (CALANDRA & BUCALA, 1996; CALANDRA & ROGER, 2003; HOI; ISKANDER; MORAND, 2007; MAKINO *et al.*, 2010).

MIF está envolvido com a gestação, principalmente nos estágios iniciais de placentação. Seu mRNA e proteína são altamente expressos em trofoblasto humano, especialmente entre a 7ª e 10ª semanas da gestação (ARCURI *et al.*, 1999; IETTA *et al.*, 2007), bem como na decídua, no sítio de implantação e no endométrio (ARCURI *et al.*, 2001; KATS *et al.*, 2005). Além disso, estudos apontam MIF como uma citocina secretada durante infecções causadas por parasitas protozoários, como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* (CHSAVANEEYAKORN *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2008; JÜTTNER *et al.*, 1998; REYES *et al.*, 2006).

Sabe-se que no terceiro trimestre da gestação, a susceptibilidade à infecção por *T. gondii* é maior quando comparada aos primeiros trimestres. Baseado nesta premissa, estudos verificaram a secreção de MIF nos diferentes estágios da gestação e perceberam maior secreção da citocina em explantes de primeiro trimestre, apontando sua importância no controle do parasito, enquanto o terceiro trimestre não apresentou o mesmo efeito, resultado que pode justificar a maior susceptibilidade ao parasito neste período (GOMES *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram que camundongos geneticamente deficientes para MIF são mais susceptíveis à infecção por *Toxoplasma gondii*, tanto da cepa RH como ME49, uma vez que esses animais

não apresentam níveis adequados de citocinas pró-inflamatórias ou moléculas co-estimuladoras (CAVALCANTI *et al*, 2011; TERRAZAS *et al.*, 2010).

Ao analisar os resultados referentes à secreção de MIF, observa-se que essa citocina foi menos secretada por células THP-1 infectadas, sugerindo que isto seja um provável mecanismo desencadeado pelo parasito, no intuito de evadir à resposta imune pró-inflamatória, a qual culminaria no controle do parasitismo e consequente combate da infecção.

Além disso, em células THP-1 infectadas, tratadas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, a secreção de MIF foi ainda menor, quando comparada às células THP-1 infectadas e não tratadas. Este resultado sugere que os fatores solúveis secretados por células BeWo tornam o microambiente da interface materno-fetal ainda mais susceptível à influência de *T. gondii*, no sentido de reduzir a secreção de MIF e tentar se manter vivo na célula hospedeira. Dessa forma, ao induzir menor secreção de MIF, *T. gondii* modula a resposta imune tornando-a menos inflamatória, o que favorece seu encistamento e a sua sobrevivência, característica, esta, que está associada à cepa ME49 de *T. gondii*.

Juntos, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que células trofoblásticas e *T. gondii*, atuam na interface materno-fetal, interagindo com células do sistema imune inato, como os monócitos, de forma a modular suas atividades funcionais. Além disso, os dados aqui demonstrados sugerem que essa modulação desencadeada pelo parasito depende, diretamente, da cepa que está sendo utilizada.

7. CONCLUSÕES

- Células THP-1 infectadas estimuladas com sobrenadante de células BeWo apresentam maior susceptibilidade à proliferação intracelular do parasito;
- Células BeWo e *T. gondii* alteram o perfil de citocinas secretadas por THP-1, infectadas ou não;
- A citocina IL-6 pode estar envolvida na maior proliferação intracelular do parasito em células THP-1 infectadas e estimuladas com sobrenadante de células BeWo não infectadas;
- Menor secreção de MIF pode estar envolvida com presença de *T. gondii*, sugerindo mecanismo de evasão à resposta imune pró-inflamatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse of primary infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1397-1401, 2004.

ABRAHAMAS, V. M.; ROMERO, R.; MOR, G. TLR-3 and TLR-4 mediate differential chemokine production and immune cell recruitment by first trimester trophoblast cells. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 53, p. 279, 2005.

ABRAHAMAS, V. M.; ALDO, P. B.; MURPHY, S. P.; VISINTIN, I.; KOGA, K.; WILSON, G.; ROMERO, R.; SHARMA, S.; MOR, G. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. **J. Immunol.**, v. 180, p. 6035-6043, 2008.

ABRAHAMAS, V. M.; BOLE-ALDO, P.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; CHAIWORAPONGSA, T.; ROMERO, R.; MOR, G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. **J. Immunol.**, v. 173, p. 4286-4296, 2004.

ADERKA, D.; MAOR, Y.; NOVICK, D.; ENGELMANN, H.; KAHN, Y.; LEVO, Y.; et al. Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia cells that is induced by tumor necrosis factor- α or - β . **Blood**, v. 81, p. 2076-2084, 1993.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **J Infect. Dis.**, v. 186 n. 5, p. 684-689, 2002.

AJZENBERG, D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? **Future Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 841-843, 2010.

ALDO, P. B.; RACICOT, K.; CRAVIERO, V.; GULLER, S.; ROMERO, R.; MOR, G. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14⁺/CD16⁺ macrophages. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 72, n. 3, p. 270-284, 2014.

ARCURI, F.; RICCI, C.; IETTA, F.; CINTORINO, M.; TRIPODI, S. A.; CETIN, I.; PAULESU, L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 64, n. 4, p. 1200-1205, 2001.

ARCURI, F.; CINTORINO, M.; VATTI, R.; CARDUCCI, A.; LIBERATORI, S.; PAULESU, L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. **Biol. Reprod.**, v. 60, n. 6, p. 1299-1303, 1999.

ARMAND, B.; SOLHJOO, K.; KORDSHOOL, M. S.; DAVAMI, M. H.; POURAHMAD, M.; ORFAEE, V. *Toxoplasma gondii* Type I, predominant genotype isolated from sheep in South of Iran. **Vet. World**, v. 10, n. 4, p. 386-392, 2017.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-630, 2007.

BARBOSA, B. F. A susceptibilidade de células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) a *Toxoplasma gondii* é aumentada por interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento beta1 (TGF- β 1). 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; MITCHELL, R. A.; MARTIN, S. B.; TRACEY, K. J.; VOELTER, W.; BUCALA, R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, v. 365, n. 6448, p. 756-759, 1993.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, p. 458-476, 2009.

BLOOM, B. R.; SHEVACH, E. Requirement for T cells in the production of migration inhibitory factor. **J. Exp. Medicine**, vol. 142, n. 5, p. 1306-1311, 2003.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BOSSHART, H.; & HEINZELMANN, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. **A. Trans. Medicine**, v. 4 n. 21, p. 438, 2016.

BUNDSCHUH, D. S.; BARSIG, J.; HARTUNG, T.; RANDOW, F.; DOCKE, W. D.; VOLK, H. D.; WENDEL, A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and INF gamma restore the systemic TNF alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. **J. Immunol.**, v. 158, p. 2862-2871, 1997.

BULMER J. N.; PACE D.; RITSON, A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 28, p. 1599-1613, 1988.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; MITCHELL, R. A.; BUCALA, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. **J. Exp. Medicine**, v. 179, n. 6, p. 1895-1902, 1994.

CALANDRA, T.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. **J. Inflamm.**, v. 47, p. 39-51, 1996.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature Rev. Immunol.**, v. 3, n. 10, p. 791-800, 2003.

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

CASTRO, A. S. Alterações funcionais induzidas por células trofoblásticas em monócitos infectados por *Toxoplasma gondii*. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J. S.; MADI, K.; FEIJÓ, D. F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; SOUZA, H. S.; BOZZA, M. T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25259, 2011.

CHSAVANEEYAKORN, S.; LUCCHI, N.; ABRAMOWSKY, C.; OTHORO, C.; CHAIYAROJ, S. C.; SHI, Y. P.; UDHAYAKUMAR, V. Immunohistological characterization of macrophage migration inhibitory factor expression in *Plasmodium falciparum*-infected placentas. **Inf. Immun.**, v. 73, n. 6, p. 3287-3293, 2005.

CHANNON, J. Y.; SEGUIN, R. M.; KASPER, L. H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4822-4826, 2000.

CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; HORNOY, P.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; BORU, J. P.; PINON, J. M. Preconception seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 489-490, 2002.

CHEN, Z.; SAKUMA, M.; ZAGO, A. C.; ZHANG, X.; SHI, C.; LENG, L.; SIMON, D. I. Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 4, p. 709-714, 2004.

CHURCH, H. J.; APLIN, J. D. BeWo choriocarcinoma cells produce laminin 10. **Biochem. J.**, v. 332, p. 491-498, 1998.

COMMODARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; BURNIER JR, M. N.; BELFORT JR, R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 345-350, 2009.

COSTELLO, M. J.; JOYCE, S. K.; ABRAHAMS, V. M. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 57, n. 1, p. 67-80, 2007.

CROCKER, I. P.; COOPER, S.; ONG, S. C.; BAKER, P. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Am. J. Pathol.**, v. 162, n. 2, p. 637-643, 2003.

DARYADEL, A.; GRIFONE, R. F.; SIMON, H. U.; YOUSEFI, S. Apoptotic neutrophils release macrophage migration inhibitory factor upon stimulation with tumor necrosis factor- α . **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 27653-27661, 2006.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; HIPPE, D.; SCHWARZ, R. T.; CARSTEN, G.; LÜDER, K. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. **Apoptosis**, v. 12, n. 4, p. 781-790, 2007.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

DESAI, T. R.; LEEPER, N. J.; HYNES, K. L.; GEWERTZ, B. L. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. **J. Surg. Res.**, v. 104, n. 2, p. 118-123, 2002.

DZITKO, K. *et al.* Phytoecdysteroids as modulators of the *Toxoplasma gondii* growth rate in human and mouse cells. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 422, 2015.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. **Vet. Parasitol.**, v. 126, n. 1, p. 57-72, 2004.

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

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

FEST, S.; ALDO, P. B.; ABRAHAMNS, V. M.; VISINTIN, I.; ALVERO, A.; CHEN, R.; CHAVEZ, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 57, n. 1, p. 55-66, 2007.

FORMENTI, N. *et al.* *Toxoplasma gondii* Infection in Alpine Red Deer (*Cervuselaphus*): Its Spread and Effects on Fertility. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138472, 2015.

FRANCO, P. S. *et al.* *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Front Microbiol.**, v. 6, p. 181, 2015.

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukin IL-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, v. 21, n. 4, p. 354-360, 2000.

GAVRILESCU, L. G.; DENKERS, E. Y. Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2577-2583, 2003.

GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; SANTOS, M. C. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am. J. Pathol.**, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, 2011.

GONZALEZ, J. M.; XU, H.; OFORI, E.; ELOVITZ, M. A. Toll-like receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 197, n. 296, p. e291-296, 2007.

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T. I.; MANASTER, I.; GAZIT, R.; YUTKIN, V.; BENHARROCK, D.; PROGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nat. Med.**, v. 12, n. 9, p. 149-163, 2006.

HE, B. et al. Protective effect of carboxymethylated chitosan on hydrogen peroxide-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 11, n. 3, p. 1629-38, 2015.

HEAZELL, A. E. P.; CROCKER, I. P. Live and let die – regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 772-783, 2008.

HEUSSLER, V. T.; KUENZI, P.; ROTTENBERG, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 11, p. 1166-1176, 2001.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 10, p. 634-40, 2002.

HIRSCHFELD, A. F.; JIANG, R.; ROBINSON, W. P.; McFADDEN, D. E.; TURVEY, S. E. Toll-like receptor 4 polymorphisms and idiopathic chromosomally normal miscarriage. **Hum. Reprod.**, v. 22, p. 440-443, 2007.

HOI, A. Y.; ISKANDER, M. N.; MORAND, E. F. Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 6, n. 3, p. 183-190, 2007.

HOUSER, B. L.; TILBURGS, T.; HILL, J.; NICOTRA, M. L.; STROMINGER, J. L. Two unique human decidual macrophage populations. **J. Immunol.**, v. 186, p. 2633-2642, 2011.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 1, p. 924-949, 2015.

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J. C. P. Apoptosis and its role in the trophoblast. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 195, n. 1, p. 29-39, 2006.

IETTA, F.; WU, Y.; ROMAGNOLI, R.; SOLEYMANLOU, N.; ORSINI, B.; ZAMUDIO, S.; CANIGGIA, I. Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta. **Am. J. Physiol. Metabol.**, v. 292, n. 1, p. E272-E280, 2007.

IMAMURA, K.; NISHIHARA, J.; SUZUKI, M.; YASUDA, K.; SASAKI, S.; KUSUNOKI, Y.; TOCHIMARU, H.; TAKEKOSHI, Y. Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 40, p. 1233-1242, 1996.

JIMENEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MacLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vector**, v. 3, n. 104, p. 1-15, 2010.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001.

JONES, H. N.; JANSSON, T.; POWELL, T. L. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 297, n. 5, p. C1228-C1235, 2009.

JÜTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; RÖLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . **J. Immunol.**, v. 161, n. 5, p. 2383-2390, 1998.

KATS, R.; AL-AKOUM, M.; GUAY, S.; METZ, C.; AKOUM, A. Cycle-dependent expression of macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium. **Hum. Reprod.**, v. 20, n. 12, p. 3518-3525, 2005.

KENDALL, G.; PEEBLES, D. Acute fetal hypoxia: the modulating effect of infection. **Early Hum. Dev.**, v. 81, n. 1, p. 27-34, 2005.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 423-432, 2004.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. **Science**, v. 258, p. 593-597.

KOGA, K.; ALDO, P. B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. **J. Obstet. Gynecol. Res.**, v. 35, n. 2, p. 191-202, 2009.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am. J. Med.**, v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008.

LANG, C.; BROB, U.; CARSTEN, G.; LUDER, K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, v. 100, n. 2, p. 191-203, 2007.

LEECH, M.; METZ, C.; HALL, P.; HUTCHINSON, P.; GIANIS, K.; SMITH, M.; MORAND, E. F. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 8, p. 1601-1608, 1999.

LIU, M.; HASSANA, S.; STILES, J. K. Heme-mediated apoptosis and fusion damage in BeWo trophoblast cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36193, 2016.

LOPES, F. M. R.; GONÇALVES, D. D.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 5, p. 496-506, 2007.

LÜDER, C. G.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 289, p. 219-237, 2005.

LUN, Z. R. et al. Cancer in the parasitic protozoans *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 112, n. 29, p. 8835-42, 2015.

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3352-3357, 2003.

MAKINO, A.; NAKAMURA, T.; HIRANO, M.; KITTA, Y.; SANO, K.; KOBAYASHI, T.; KAWABATA, K. I. High plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with adverse long-term outcome in patients with stable coronary artery disease and impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 213, n. 2, p. 573-578, 2010.

MANTHEY, C. L.; VOGEL, S. N. The role of cytokines in host responses to endotoxin. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 3, p. 72-79, 1992.

MICHELON, T.; NEUMANN, J.; GRAUDENZ, M.; SILVEIRA, J. G. D. Imunologia da gestação. **Rev. AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 145-151, 2006.

MITCHELL, R. A.; LIAO, H.; CHESNEY, J.; FINGERLE-ROWSON, G.; BAUGH, J.; DAVID, J.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 345-350, 2002.

MITCHELL, R. A.; METZ, C. N.; PENG, T.; BUCALA, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 25, p. 18100-18106, 1999.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 12, p. 1965-1975, 2004.

MOR, G.; CARDENAS, I.; ABRAHAMAS, V.; GULLER, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, p. 80-87, 2011.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; REGINA, M. L.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute Toxoplasmosis to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **J. Immunol.**, v. 167, n. 8, p. 4574-4584, 2001.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, vol. 17, no. 3, p. 138-146, 1996.

NARUSE, K.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; ROBSON, S. C.; SEARLE, R. F.; LASH, G. E. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, v. 86, n. 2, p. 148-150, 2010.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10^a ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-156, 2003.

NING, H. R. *et al.* Sequence variation in the *Toxoplasma gondii* ROP20 gene among strains from different hosts and geographical locations. **Genet. Mol. Res.**, v. 14, n. 3, p. 8414-9, 2015.

NISHIHARA, J.; KOYAMA, Y.; MIZUE, Y. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 10, n. 3, p. 199-205, 1998.

OPFERMAN, J. T.; KORSMEYER, S. J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 5, p. 410-415, 2003.

PATTILLO, R. A.; GEY, G. O. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells *in vitro*. **Cancer. Res.**, Baltimore, v. 28, n. 7, p. 1231-1236, 1968.

PICCINNI, M.-P.; LOMBARDELLI, L.; LOGIODICE, F.; KULLOLLI, O.; PARRONCHI, P.; ROMAGNANI, S. How pregnancy can affect autoimmune diseases progression? **Clinical and Molecular Allergy: CMA**, 2016.

PLATTNER, F.; SOLDATI-FRAVE, D. Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 471-487, 2008.

RANGO, U. V. Fetal tolerance in human pregnancy – A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunol. Lett.**, v. 115, n. 1, p. 21-32, 2008.

REMYINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONT, G. Infectious diseases in the fetus and newborn infant. In: (Ed.). **Toxoplasmosis**, 5^a ed., 2001.

REY, L. **Parasitologia**, 2^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 2001.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L. I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; RODRÍGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Inf. Immun.**, v. 74, n. 6, p. 3170-3179, 2006.

ROBERTSON, S. A.; O'CONNELL, A.; RAMSEY, A. The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.**, v. 31, p. 97-98, 2000.

ROBINSON, D. P.; KLEIN, S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 263–271, 2013.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis: prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod. Toxicol.**, v. 21, n. 4, p. 458-472, 2006.

ROSSI, A. G.; HASLETT, C.; HIRANI, N.; GREENING, A. P.; RAHMAN, I.; METZ, C. N.; BUCALA, R.; DONNELLY, S. C. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 12, p. 2869-2874, 1998.

SAREMY, S. *et al.* Identification of potential apicoplast associated therapeutic targets in human and animal pathogen *Toxoplasma gondii* ME49. **Bioinformation**, v. 7, n. 8, p. 379-83, 2011.

SCHATZ, F.; SODERLAND, C.; HENDRICKS-MUNOZ, K. D.; GERRETS, R. P.; LOCLWOOD, C. J. Human endometrial endothelial cells: isolation, characterization, and inflammatory-mediated expression of tissue factor and type 1 plasminogen activator inhibitor. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 691-697, 2000.

SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S.; DINARELLO, C. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, v. 75, p. 40-47, 1980.

SEKI, H.; MATUOKA, K.; INOOKU, H.; TAKEDA, S. TNF- α from monocyte of patients with pre-eclampsia induced apoptosis in human trophoblast cell line. **J. Obstet. Gynecol. Res.**, v. 33, n. 4, p. 408-416, 2009.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology research**, v. 105, n. 4, p. 893-898, 2009.

STANDIFORD, T. J.; STRIETER, R. M.; LUKAS, N. W.; KUNKEL, S. L. Neutrolization of IL-10 increases lethality in endotoxemia: cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, v. 155, p. 2222-2229, 1995.

STEPHANOU, A.; HANDWERGER, S. Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 719-723, 1994.

SYKES, L.; MACINTYRE, D. A.; YAP, X. J.; PONNAMPALAM, S.; TEOH, T. G.; BENNETT, P. Changes in the Th1:Th2 Cytokine Bias in Pregnancy and the Effects of the Anti-Inflammatory Cyclopentenone Prostaglandin 15-Deoxy—Prostaglandin. **Mediators Inflamm.**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

SYKES, L.; MACINTYRE, D. A.; YAP, X. J.; TEOH, T. G.; BENNETT, P. R. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators Inflamm.**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

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

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocyte leukemia cell line. **Int. J. Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, 1980.

UNNO, A.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Up-regulation of hyaluronan receptors in *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 391, n. 1, p. 477-480, 2010.

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R., JR.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 139, p. 350-351, 2005.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; LÉON-NAVA, M. A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine Mechanisms Associated with Resistance or Susceptibility to Parasitic Diseases during Pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 114-121, 2009.

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDE, M.; PINON, J.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 160-162, 2004.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J. Clin. Inv.**, v. 101, n. 2, p. 311-320, 1998.

WANG, Y.; YIN, H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 384, 2015.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T(H)2 phenomenon? **Immunol. Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.

WONG, P. K. K.; CAMPBELL, I. K.; EGAN, P. J.; ERNST, M.; WICKS, I. P. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. **Arthritis & Rheumatology**, v. 48, n. 5, p. 1177-1189, 2003.

YIN, N.; ZHANG, H.; LUO, X.; DING, Y.; XIAO, X.; LIU, X.; SHAN, N.; ZHANG, X.; DENG, Q.; ZHUANG, B.; QI, H. IL-27 activates human trophoblasts to express IP-10 and IL-6: implications in the immunopathophysiology of preeclampsia. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

ZHANG, L.; ZHAO, M.; JIAO, F.; ZU, X.; LIU, X.; JIANG, Y.; ZHANG, H.; OU, X.; HU, X. Interferon gamma is involved in apoptosis of trophoblast cells at the maternal-fetal interface following *Toxoplasma gondii* infection. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 30, p. 10-16, 2015.

ZITNIK, R. J.; ELIAS, J. A. Interleukin-6 and the lung. **Cytokines of the Lung**, p. 229-280.