

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

A proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rP21) modula a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR-8/SVneo) e em vilos placentários humanos

Guilherme de Souza

Uberlândia
Agosto, 2021

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

A proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rP21) modula a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR-8/SVneo) e em vilos placentários humanos

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

GUILHERME DE SOUZA

Orientadora: Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Coorientador: Dr. Claudio Vieira da Silva

Uberlândia
Agosto, 2021

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

S729 2021	Souza, Guilherme de, 1996- A proteína recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i> (rP21) modula a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR-8/SVneo) e em vilos placentários humanos [recurso eletrônico] / Guilherme de Souza. - 2021. Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa. Coorientador: Claudio Vieira da Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.465 Inclui bibliografia. 1. Imunologia. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-, (Orient.). II. Silva, Claudio Vieira da, 1972-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título. CDU: 612.017
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 271 do PPIPA				
Data:	Trinta de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	14 h	Hora de encerramento:	18h e 07min
Matrícula do Discente:	11912IPA004				
Nome do Discente:	Guilherme de Souza				
Título do Trabalho:	A proteína recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i> (rP21) modula a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR-8/SVneo) e em vilos placentários humanos				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das Interações entre Patógenos e seus Hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Participação funcional do fator de inibição da migração de macrófago (mif) e outras citocinas em trofoblasto humano infectado por <i>toxoplasma gondii</i> : estudo in vitro em linhagem de coriocarcinoma humano (bewo) e explantes de placentas				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos(as) professores(as) Titulares: Dra. Angelica de Oliveira Gomes - UFTM; Dra. Thaise Lara Teixeira - UNIFESP e Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - ICBIM/UFU (Presidente) e orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da banca, Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, 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 o tempo de resposta, foram conforme as normas do programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato.

Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

APROVADO.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. 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 **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2021, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 12:30, 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 **Thaise Lara Teixeira, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 12:47, 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 **2996049** eo código CRC **B77D5FF2**.

Dedicatória

Após 2 anos e meio, termino uma das etapas mais importantes da minha vida. Nunca imaginei que um dia estaria aqui, e sem o apoio da minha família nada disso seria possível. Dedico esse trabalho à minha mãe Cássia, que com muito esforço conseguiu nos dar a melhor educação e sempre nos incentiva para ir atrás dos nossos sonhos. Aos meus irmãos Augusto e Nathália, obrigado pelo apoio nessa jornada. Em especial, dedico esse trabalho à minha irmã Luana, que é meu braço direito, e que sem seu apoio nada disso seria possível. Obrigado pela sua ajuda durante todos esses anos, espero algum dia conseguir retribuir todo o esforço que você faz por nós.

Agradecimento especial

Agradeço imensamente minha orientadora, Dra. Bellisa de Freitas Barbosa. Estar aqui hoje representa uma grande conquista pessoal, e você foi/é fundamental nesse processo. Obrigado por ter me aceitado no laboratório, e principalmente, pelas inúmeras portas que você abriu durante esses anos. Agradeço as oportunidades, orientação, confiança, conversas e dicas durante esse tempo. Tenho muita admiração pela sua ética, profissionalismo e dedicação em tudo que faz. Você é um grande exemplo de professora, orientadora, pesquisadora e pessoa não só para mim, mas para todo o laboratório.

Muito obrigado!!

Agradecimentos

Agradeço minha Madrinha Ilda e meu padrinho Almir, que mesmo distantes, sempre me incentivaram e ajudaram em tudo que precisei.

Agradeço meus amigos: Ari, Débora, Dieine, Dudu, Henrique, Lucas, Paola e Thais. Obrigado pelo apoio durante esses anos, sei que posso contar com cada um de vocês.

Agradeço à Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório, pelos ensinamentos e confiança depositada em todo o grupo.

Agradeço ao Dr. Claudio Vieira da Silva, por permitir ter trabalhado com a proteína que você descobriu, e por abrir as portas do seu laboratório sempre que precisamos.

Agradeço todo o grupo do laboratório de Imunofisiologia da Reprodução: Alessandra, Andressa, Carol, Fernanda, Gabriel, Idessânia, Iliana, Luana, Maria Thereza, Mayara, Pâmella, Priscila, Rafaela, Samuel e Thádia. Obrigado pela ajuda em tudo que precisei e pelos momentos de descontração durante esses anos.

Agradeço todo o grupo do laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), que sempre recebeu de portas abertas e auxiliaram em tudo que precisei.

Agradeço à Dra. Neide Maria Silva, por abrir as portas do seu laboratório para tudo que precisamos. Agradeço imensamente seus alunos: Andrea Tatiana, Estér, Flávia, Marcos Paulo e Yusmaris por toda ajuda durante esse período.

Agradeço às técnicas Mariani (confocal) e Vanessa (Parasitologia) pela disponibilidade em ajudar mesmo nesses tempos tão difíceis.

Agradeço à banca avaliadora: Dra. Angelica de Oliveira Gomes, Dra. Thaise Lara Teixeira e Dra. Rafaela José da Silva, por terem aceitado o convite e pelas contribuições feitas para melhorar o trabalho.

Agradeço às secretárias do PPIPA, Lucélia e Claudia, por toda ajuda durante esses anos.

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFAP1 - actin filament associated protein 1

AFAP1L1 - actin filament associated protein 1 like 1

AIDS - síndrome de imunodeficiência adquirida

BSA - soro albumina bovina

CD - grupo de diferenciação

COX-2 - ciclooxigenase-2

CPRG - clorofenol red- β -D-galactopiranosídeo

CXCR4 - receptor de quimiocina CXC tipo 4

ERK1/2 - quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2

H₂DCFDA - 2',7' diacetato de diclorofluoresceína

hCG - gonadotrofina coriônica humana

hPL - hormônio lactogênico placentário

IDO - indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ - interferon- γ

IL - interleucina

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa – Kilo Dalton

LPS – lipopolissacarídeo

MIF - fator inibidor da migração de macrófagos

MMP9 - metaloproteinase 9

MPO – mieloperoxidase

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo

NAG - N-acetilglicosaminidase

NK - célula natural killer

NO - óxido nítrico

°C - graus Celsius

DO - densidade óptica

PAMPs – padrões moleculares associados aos patógenos

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PGE₂ - prostaglandina E₂

PGN - PBS + 0,15% de gelatina + 0,1 % de azida

PGN-saponina - PGN + 0,1% de saponina

pH - potencial hidrogeniônico

PI3K - PI3-quinase

PPD - parafenilenodiamina

RPM - rotação por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

sFlt-1 - soluble fms-like tyrosine kinase 1

TGF- β 1 - fator de crescimento beta-1

Th - T helper

TLR - receptor semelhante a Toll

TMB - 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRITC - isotiocianato de tetrametilrodamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : características gerais.....	4
1.2. Toxoplasmose.....	5
1.3. Toxoplasmose congênita.....	6
1.4. Células trofoblásticas humanas e vilos coriônicos humanos.....	7
1.5. Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	9
1.6. Resposta imune na gestação.....	10
1.7. Proteína 21 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo.....	17
4.2. Coleta de placentas humanas.....	17
4.3. Manutenção de <i>T. gondii</i>	18
4.4. Purificação da rP21.....	18
4.5. Ensaio de viabilidade celular.....	19
4.6. Ensaio de invasão e proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo, HTR-8/SVneo.....	20
4.6.1. Infecção e tratamento simultâneo com rP21(invasão).....	20
4.6.2. Tratamento após 3 h de infecção (proliferação).....	21
4.6.3. Pré-tratamento das células com a rP21 por 24 h (invasão e proliferação).....	21
4.6.4. Ensaio de reinfecção (invasão e proliferação).....	21
4.6.5. Ensaio de reversibilidade (proliferação).....	22
4.7. Análise da polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	23
4.8. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	23
4.9. Dosagem de citocinas por ELISA indireto.....	24
4.10. Viabilidade de vilos coriônicos humanos tratados com rP21.....	25
4.11. Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em vilos coriônicos humanos.....	25
4.12. Análise estatística.....	26

5. RESULTADOS.....	27
5.1. A rP21 não diminui a viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo.....	27
5.2. A rP21 aumenta a invasão de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	27
5.3. A rP21 diminui a proliferação de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	27
5.4. O pré-tratamento com a rP21 por 24 h aumenta a invasão de <i>T. gondii</i> em células BeWo e diminui a proliferação em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	28
5.5. A rP21 não altera a viabilidade de <i>T. gondii</i> , permitindo uma maior capacidade de reinfecção em células BeWo, mas diminuindo a proliferação em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	28
5.6. A remoção da rP21 tende a reverter o efeito da proliferação de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR-8/SVneo.....	29
5.7. A rP21 induz a polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo, mas não em HTR-8/SVneo.....	29
5.8. A rP21 tende a diminuir a produção de ROS em células BeWo e diminui em HTR-8/SVneo.....	30
5.9. A rP21 tende a induzir uma maior produção de MIF e diminuem a produção de IL-8 em células BeWo.....	30
5.10. A rP21 induz uma menor produção de MIF e aumenta a produção de IL-6 em células HTR-8/SVneo.....	31
5.11. A rP21 não altera a viabilidade e aumenta a proliferação de <i>T. gondii</i> em vilos coriônicos humanos.....	32
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÃO.....	38
8. FIGURAS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	65

RESUMO

A proteína recombinante 21 de *Trypanosoma cruzi* (rP21) é uma proteína secretada por este parasito que é importante para a sua invasão e controle da proliferação na célula hospedeira. Além disso, estudos mostram que essa proteína tem atividade antiangiogênica, quimiotática, inflamatória e antitumoral. No entanto, não se sabe o impacto dessa proteína na infecção por outros patógenos, como por exemplo, *Toxoplasma gondii*, especialmente na interface materno-fetal. Assim, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o papel da rP21 na infecção por *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo e em vilos coriônicos humanos. Nós observamos que a rP21 não tem efeito citotóxico em células BeWo e HTR-8/SVneo, e que o tratamento concomitante à infecção induziu uma maior invasão de *T. gondii* nas duas linhagens celulares. Em adição, o tratamento pós infecção induziu uma menor proliferação de *T. gondii* nos dois tipos celulares, e que esse efeito da proliferação foi parcialmente revertido com a retirada da rP21. Além disso, nós observamos que o tratamento prévio das células, com exceção da concentração de 40 µg/mL em células BeWo, não alterou a invasão de *T. gondii*. Por outro lado, o tratamento prévio diminuiu a proliferação de *T. gondii* nos dois tipos celulares. Nós investigamos alguns mecanismos que poderiam estar envolvidos com a diminuição da proliferação intracelular e observamos que a rP21 induziu a polimerização do citoesqueleto de actina, diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio, e induziu um aumento de citocinas pró-inflamatórias em células BeWo e HTR-8/SVneo. Por outro lado, nos vilos coriônicos humanos, a rP21 induziu um aumento na proliferação de *T. gondii*, mas os mecanismos envolvidos com esse aumento precisam ser elucidados. Assim, nós concluímos que a rP21, assim como para o *T. cruzi*, pode ser benéfica para *T. gondii*, uma vez que ela auxilia a entrada do parasito, e uma vez lá dentro, induz mecanismos intracelulares que pode ajudar o parasito a se manter na célula hospedeira, contribuindo para a infecção por *T. gondii*.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, P21, trofoblasto humano, vilos coriônicos humanos, transmissão transplacentária.

ABSTRACT

The recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 (rP21) is a protein secreted by this parasite that is important for its invasion and control of proliferation in the host cell. Furthermore, studies have shown that this protein has antiangiogenic, chemotactic, inflammatory and antitumor activity. However, the impact of this protein on infection by other pathogens, such as *Toxoplasma gondii*, especially at the maternal-fetal interface, it is not understood. Thus, this work aimed to evaluate the role of rP21 in *T. gondii* infection in BeWo and HTR-8/SVneo cells and in human chorionic villous. We observed that rP21 did not decrease cell viability and that concomitant treatment with infection increased *T. gondii* invasion in BeWo e HTR-8/SVneo cells. In addition, post-infection treatment decreased *T. gondii* proliferation in both cell types, and this proliferation effect was slightly reversed with the removal of rP21. Furthermore, we observed that the pre-treatment of the cells, except the concentration of 40 µg/mL, did not alter *T. gondii* invasion. On the other hand, pre-treatment decreased *T. gondii* proliferation in both cell types. We investigated some mechanisms that could be involved with the decrease in intracellular proliferation and observed that rP21 induced actin cytoskeleton polymerization, decreased reactive oxygen species production, and induced an increase of pro-inflammatory cytokines in BeWo and HTR-8/SVneo cells. On the other hand, in human chorionic villous, rP21 induced an increase in *T. gondii* proliferation, but the mechanisms involved with this increase need to be elucidated. Thus, we conclude that rP21, as well as for *T. cruzi*, may be beneficial to *T. gondii*, as it helps the parasite to invade, and once inside, it induces intracellular mechanisms that can help the parasite to survive in the host cell, contributing to *T. gondii* infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, P21, human trophoblast, human chorionic villous, transplacental transmission.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, sendo considerado um dos parasitos mais bem-sucedidos devido a sua capacidade de infectar todos os vertebrados de sangue quente, como as aves e os mamíferos, incluindo os seres humanos, representando um grande problema de saúde pública (TENTER et al., 2000; DUBEY et al., 2014; MURALIKRISHNA et al., 2017).

Morfologicamente, semelhante a qualquer célula eucariótica, *T. gondii* possui organelas padrão, como retículo endoplasmático, um único Golgi e uma mitocôndria. Além disso, o parasito é caracterizado pela presença do complexo apical, uma região composta por organelas especializadas como as micronemas, roptrias, grânulos densos e apicoplasto. Essas organelas são importantes para a fixação, invasão e sobrevivência na célula hospedeira (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; COPPENS et al., 2017; BOOTHROYD; HAMIKI, 2020).

T. gondii possui três estágios infecciosos: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (DUBEY, 1998; OZGONUL; BESIRLI, 2017). Os taquizoítas estão presentes na fase aguda da infecção, e possuem uma rápida multiplicação por endodiogenia dentro de um compartimento intracelular denominado vacúolo parasitóforo. Os taquizoítas são capazes de infectar todo tipo de célula nucleada e se disseminar por todo o corpo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; BLADER et al., 2015). Por pressão do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas se convertem em bradizoítas, passando para um estágio de multiplicação mais lenta, formando os cistos teciduais, sendo prevalentes em infecções crônicas. No interior dos cistos, os bradizoítas se dividem por endodiogenia, formando duas células filhas. A parede membranosa que recobre os cistos permite uma maior resistência dos bradizoítas às enzimas presentes no suco gástrico, permitindo sua transmissão por meio da ingestão (FERGUSON, 2004; BLADER et al., 2015). Os cistos se desenvolvem intracelularmente e podem conter milhares de bradizoítas viáveis que podem persistir por anos no hospedeiro, sendo o músculo esquelético, músculo cardíaco e o sistema nervoso os locais mais comuns da infecção, embora cistos também tenham sido encontrados no pulmão, fígado e rins (DUBEY, 1998; HARKER; UENO, LODOEN, 2015; MENDEZ; KOSHY, 2017). Os esporozoítas são encontrados no interior de oocistos maduros, sendo formados no trato intestinal e liberados junto às fezes dos hospedeiros definitivos, os felinos. Esses oocistos são estruturas ovóides que em ambientes favoráveis de umidade, calor e clima, sofrem esporulação,

contendo dois esporocistos, e cada um possui quatro esporozoítas. A parede do oocisto é uma estrutura com multicamadas que protege o parasito de mudanças químicas e mecânicas, permitindo que ele sobreviva por mais de um ano no ambiente externo (MONTROYA, LIENSENFELD, 2004; MAI et al., 2009; YAN et al., 2016).

O ciclo de vida de *T. gondii* inclui uma fase assexuada e sexuada, tendo como hospedeiros definitivos os gêneros *Felis* e *Lynx*, e hospedeiros intermediários as aves e mamíferos, incluindo o homem (DUBEY, 1998; DUBEY, 2020). A fase sexuada, que ocorre nos hospedeiros definitivos, começa quando ocorre a ingestão de cistos contendo bradizoítas pelos felinos, levando a liberação de parasitos na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, onde se replicam por esquizogonia e formam esquizontes. O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização através da divisão da membrana plasmática, originando os merozoítas. Estes, por sua vez, dão origem aos gametas, e havendo fecundação, formam-se oocistos. Após cair na luz intestinal, os oocistos são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais. A ingestão de alimentos contaminados, tanto com cistos quanto com oocistos, pode levar a infecção de hospedeiros intermediários, pois estes liberam bradizoítas e esporozoítas, respectivamente, que em seguida vão se transformar em taquizoítas capazes de invadir e se disseminar pelas células do indivíduo, ocorrendo a fase assexuada (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; AL-MALKI, 2021). Para os seres humanos, as vias mais importantes de transmissão são através da ingestão de carne mal cozida contendo cistos, vegetais mal lavados, água ou solo contaminado com oocistos e via transmissão vertical, ou seja, da mãe para o feto ou embrião (AZADI et al., 2020; TONG et al., 2021).

1.2. Toxoplasmose

T. gondii é o agente causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns em humanos e animais de sangue quente. Estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas estão cronicamente infectadas com *T. gondii* em todo o mundo, com as maiores taxas de incidência na América do Sul, Sudoeste Asiático e África (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; DUBEY et al., 2014).

Logo após a infecção, os taquizoítas se multiplicam rapidamente em diferentes tipos celulares, caracterizando a fase aguda da infecção. Em indivíduos imunocompetentes, aproximadamente 10-20% dos casos tornam-se sintomáticas, sendo, portanto, a maioria dos casos assintomáticos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No entanto, algumas manifestações clínicas podem ocorrer, como a febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e

cefaleia (HILL, DUBEY, 2002). Após 2 a 3 semanas de infecção, devido a uma resposta eficaz do hospedeiro, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas, formando os cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da infecção (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). Em caso de imunodeficiência, particularmente em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os bradizoítas liberados após a ruptura do cisto são convertidos em taquizoítas, cuja proliferação não é efetivamente controlada pela resposta imune do hospedeiro, levando à encefalite (KAMERKAR; DAVIS, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No entanto, a patologia da doença depende de alguns fatores, como a carga parasitária, virulência da cepa, e fatores intrínsecos ao hospedeiro, como o estado imunológico e histórico genético dos indivíduos (WEISS; DUBEY, 2009).

1.3. Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita é considerada uma das formas mais graves da doença, e ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação, alcançando assim a circulação e os tecidos fetais, podendo levar a graves implicações para as pessoas afetadas desde o feto até a idade adulta (MONTROYA; REMINGTON, 2008; HALONEN; WEISS, 2013; FALLAHI et al., 2018). Entretanto, sabe-se que o risco para o feto depende de vários fatores, como o estado imunológico e o genótipo da mãe, o genótipo e a virulência do parasito, bem como o período gestacional em que a infecção é adquirida. Outros determinantes da doença incluem a carga parasitária, se a infecção é iniciada com oocistos ou cistos teciduais ou a ocorrência de coinfeções (CARLIER et al., 2012; HALONEN; WEISS, 2013).

Nesse sentido, a placenta desempenha um papel fundamental, pois é uma barreira natural que protege o feto a exposição de patógenos (ABBASI et al., 2003). No entanto, o risco de infecção fetal e o comprometimento fetal dependem do estágio da gravidez quando ocorre a infecção materna (BORGES et al., 2019). Assim, o risco de infecção fetal no primeiro trimestre é em torno de 10-25%, no entanto o comprometimento fetal é grave e pode levar ao aborto. No segundo trimestre, as chances de transmissão aumentam para 30%, enquanto que no terceiro trimestre pode variar entre 60% a 90%, mas o comprometimento fetal é menor (RORMANN et al., 2006; MCLEOD et al., 2009; GARCIA-MERIC et al., 2010). Se a infecção ocorrer antes da gravidez, o risco para o feto é extremamente baixo, mesmo se a mãe for exposta a outra infecção. No entanto, alguns estudos mostram que a reativação da doença pode ocorrer durante a gravidez e pode resultar em efeitos adversos no feto em desenvolvimento (GARWEG et al., 2005; CARLIER et al., 2012; CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014).

Os sintomas da toxoplasmose congênita incluem a coriorretinite, hidrocefalia, microcefalia, epilepsia, cegueira, estrabismo, calcificações intracranianas, entre outros sintomas (JONES; LOPES; WILSON, 2003; LI et al., 2014). Geralmente, bebês infectados no terceiro trimestre são assintomáticos, mas pode apresentar sintomas durante a infância ou na fase adulta (WALLON et al., 2001; MONCADA; MONTOYA, 2012; SCHLUTER; BARRAGAN, 2019). No Brasil, a incidência da toxoplasmose congênita varia de 3 a 10 casos a cada 10 mil nascidos vivos (CARLIER et al., 2012).

1.4. Células trofoblásticas humanas e vilos coriônicos humanos

A interface materno-fetal constitui a principal barreira entre os compartimentos materno e fetal durante a gravidez. Ela é composta pela decídua materna e pela placenta que é originada por células fetais (BURTON; JAUNIAUX, 2015; TURCO; MOFFETT, 2019).

Nos humanos, a estrutura da placenta humana é composta de vilosidades flutuantes e de ancoragem. O sinciotrofoblasto é uma camada de células multinucleadas que reveste a superfície mais externa das vilosidades da placenta humana e atua como a principal barreira celular entre o compartimento fetal e o sangue materno (HUPPERTZ; GAUSTER, 2011; MAYHEW, 2014). Além disso, essa camada de células facilita o transporte de nutrientes, gases e resíduos através da interface materno-fetal, além de produzir gonadotrofina coriônica humana (hCG) e progesterona, hormônios importantes para a gravidez (MALASSINE; FRENDON; EVAIN-BRITON, 2003; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). Subjacente ao sinciotrofoblasto, está o citotrofoblasto, uma camada de células individualizadas, com alta capacidade proliferativa, e que podem se fundir para repor a camada de sinciotrofoblasto. O citotrofoblasto é dividido em trofoblasto viloso e extraviloso. O trofoblasto viloso é importante para a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto, enquanto que o trofoblasto extraviloso é responsável pela migração e invasão na decídua, e estão localizados nas extremidades dos vilos de ancoragem (APLIN, 1991; ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

Assim, a placenta é uma importante barreira física que precisa ser mantida intacta a fim de proteger o organismo contra a infecção por patógenos (ARORA et al., 2017; ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019; COSTA; NOBREGA; ANTOLINI-TAVARES, 2020). No entanto, alguns patógenos são capazes de atravessar essa barreira e podem induzir consequências para o feto em desenvolvimento, como por exemplo, *T. gondii*. Como dito anteriormente, o risco da transmissão vertical aumenta de acordo com a idade gestacional. Esse risco aumentando pode ser devido a alterações na estrutura da placenta. No início da gestação, a barreira placentária atinge uma espessura de 50-100 µm e diminuiu progressivamente para

2,5-5 μm no final da gravidez, permitindo que os patógenos invadam de forma mais fácil os trofoblastos (BLASZKOWSKA; GÓRALSKA, 2014; HOO; NAKIMULI; VENTO-TORMO, 2020). Além disso, de acordo com o prosseguimento da gestação, a camada de trofoblasto viloso se torna descontínua e diminui sua capacidade proliferativa, fazendo com que a camada de sinciciotrofoblasto se torne mais fina e descontínua, levando à uma diminuição da barreira placentária (CARLIER et al., 2012; ROBBINS et al., 2012). Portanto, para compreender a interação de parasitos intracelulares, como *T. gondii*, e a interface materno-fetal, alguns modelos têm sido utilizados para estudar essa interação, incluindo linhagens de células trofoblásticas e explantes de vilos coriônicos humanos.

Células BeWo foram isolados de um coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey. Essas células possuem muitas características de trofoblasto viloso humano, pois secretam hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol (WOLFE, 2006). Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que células BeWo foram susceptíveis a infecção por *T. gondii* na presença de IL-10 e fator de crescimento beta-1 (TGF- β 1) (BARBOSA et al., 2008). Em outro estudo do nosso grupo, Castro e colaboradores (2013) demonstraram que células BeWo foram capazes de modular a atividade de monócitos humanos, que foram capazes de controlar a infecção por *T. gondii*. Adicionalmente, Barbosa e colaboradores (2014) demonstraram que células BeWo estimuladas com baixas concentrações de MIF mostraram forte fosforilação de ERK1/2 e significativa produção de prostaglandina E_2 (PGE $_2$), o que coincidiu com uma maior proliferação intracelular de *T. gondii*. Em contrapartida, altas concentrações de MIF em células BeWo não fosforilaram ERK1/2 e não contribuíram para a liberação de PGE $_2$, controlando a carga parasitária, mostrando a importância deste mediador lipídico durante a infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas.

Células HTR-8/SVneo foram geradas a partir de isolados de trofoblasto extraviloso de placentas de primeiro trimestre. Posteriormente, elas foram transfectadas com um plasmídeo contendo o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (GRAHAM et al., 1993). Entre todas as linhagens de trofoblasto extraviloso, a HTR-8/SVneo é a mais utilizada para estudos de invasão, migração e interação com outras células na interface materno-fetal (DING et al., 2016; YANG et al., 2016). Um estudo do nosso grupo mostrou que *T. gondii* modula os altos índices de apoptose em células HTR-8/SVneo, o que favoreceria o seu estabelecimento dentro das células hospedeiras. Entretanto, o tratamento dessas células com meio condicionado de macrófagos não infectados restaurou as taxas de apoptose, sugerindo que *T. gondii* modula a interação entre macrófagos e o trofoblasto extraviloso (GUIRELLI et al., 2015). Recentemente, Milian e

colaboradores (2019) demonstraram que *T. gondii* induziu uma maior produção de MIF em células HTR-8/SVneo, o que levou ao aumento da expressão do seu co-receptor (CD44), desencadeando a fosforilação de ERK1/2 e ativando ciclooxygenase-2 (COX-2), e aumentando a produção de IL-8, o que favoreceu a proliferação do parasito.

Além dos modelos celulares, os vilos coriônicos humanos também podem ser utilizados para compreender melhor a interação de patógenos e a interface materno-fetal. Nosso grupo de pesquisa utiliza vilos coriônicos humanos como modelo experimental da toxoplasmose congênita e alguns estudos já foram realizados, como a avaliação do efeito de MIF na infecção por *T. gondii* em vilos placentários de primeiro e terceiro trimestre gestacional (GOMES et al., 2011) e a busca de tratamentos alternativos para a toxoplasmose congênita (CASTRO-FILICE et al., 2014; SILVA et al., 2017; FRANCO et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020; COSTA et al., 2021).

Portanto, células BeWo e HTR-8/SVneo, além dos vilos coriônicos humanos, são consideradas modelos apropriados para a realização de estudos *in vitro* e *ex vivo* sobre a interação de *T. gondii* com a interface materno-fetal.

1.5. Resposta imune contra *T. gondii*

A resposta imune inicial contra *T. gondii* é mediada primariamente por células T *helpers* 1 (Th1), e requer componentes da resposta imune inata e adaptativa, envolvendo interações entre o parasito, monócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células *natural killers* (NKs) (GAZZINELLI et al., 2014; MAHMOUDZADEH et al., 2021).

No início da infecção, *T. gondii* é reconhecido por células da imunidade inata através de receptores semelhantes a *Toll* (TLRs) que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), dando início a ativação do sistema imune (FISCH; CLOUGH; FRICKEL, 2019). Estudos feitos em camundongos mostram que TLR11 e TLR12 são importantes para o reconhecimento de *T. gondii* (YAROVINSKY et al., 2005; ANDRADE et al., 2013; KOBLANSKY et al., 2013). No entanto, o papel de TLRs humano no reconhecimento de *T. gondii* é pouco conhecido, uma vez que TLR11 não é funcional no genoma humano e TLR12 não está presente (GAZZINELLI et al., 2014). Estudos mostram que o parasito pode ser reconhecido em humanos por TLRs que reconhecem ácidos nucleicos, uma vez que monócitos humanos e células dendríticas foram ativadas pelo DNA do parasito, provavelmente através de TLR7, TLR8 e TLR9, e foram capazes de produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (ANDRADE et al., 2013). Segundo Denkers e colaboradores (2010), ainda não há evidências de que exista um TLR principal que controle a

resposta imune contra *T. gondii*, sugerindo que a resistência do hospedeiro à infecção está relacionada a vários ligantes de TLRs.

Uma vez reconhecido, o parasito estimula a síntese de IL-12 nas células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, e induz a síntese de interferon γ (IFN- γ) pelas células NKs (GIGLEY, 2016). Em adição, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) pode agir em sinergia com a IL-12, otimizando a produção de IFN- γ por essas células (GAZZINELLI et al., 1993; GAZZINELLI et al., 2014; GE et al., 2014). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias está associada com a ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, que atuam produzindo e secretando diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), e induz o aumento ainda maior nos níveis de IL-12 e IFN- γ (MILLER et al., 2009; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). O IFN- γ , por sua vez, ativa as células dendríticas, os macrófagos e os neutrófilos, promovendo a redução ou a eliminação de *T. gondii* (FISCH; CLOUGH; FRICKEL, 2019). Quando os macrófagos são ativados pelo IFN- γ , eles produzem NO, permitindo uma ação tóxica contra o parasito. Além disso, essa citocina induz a produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), levando a degradação do triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito, o que permite a inibição da replicação ou a destruição de *T. gondii* por essas células (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012). Além do IFN- γ e da IL-12, outras citocinas pró-inflamatórias são importantes no combate a infecção por *T. gondii*, como a IL-6, fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e TNF- α (SILVA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2020; COSTA et al., 2021).

No entanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode levar o hospedeiro a morte (MELCHOR; EWALD, 2019). Assim, é importante que tenha um balanço entre um perfil das respostas Th1 e Th2. Esse balanço pode ser mediado pela produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β 1, que atuam diminuindo a produção de NO em macrófagos, a atividade citotóxica de células NKs e a maturação de células dendríticas (WILLE et al., 2001).

Dessa forma, o combate à infecção por *T. gondii* é mediado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células do sistema imune inato e adaptativo. No entanto, *T. gondii* é capaz de evadir da resposta imune do hospedeiro. Portanto, o sucesso da infecção ou o combate ao parasito está associado com o balanço entre a resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão utilizados por *T. gondii* (MILLER et al., 2009; MELO et al., 2011).

1.6. Resposta imune na gestação

Durante a gestação, a presença do feto e da placenta alteram a imunidade e a fisiologia materna para permitir uma gravidez bem-sucedida. Nesse período, o sistema imune materno é

caracterizado por apresentar três fases imunológicas distintas que se caracterizam por processos biológicos distintos (SAITO; MIYAZAKI; SASAKI, 2006; RACICOT et al., 2014).

O processo de implantação e formação da placenta requer uma forte resposta pró-inflamatória, sendo importante para o blastocisto invadir e se implantar no endométrio, remodelamento dos vasos sanguíneos maternos para assegurar um suprimento sanguíneo adequado da mãe para o feto, além de garantir um reparo adequado do epitélio uterino e a remoção de resíduos celulares (DEKEL et al., 2010). Durante o segundo trimestre gestacional, a interface materno-fetal é caracterizada por uma tolerância materna, onde se tem uma prevalência de uma resposta anti-inflamatória, sendo importante para um rápido desenvolvimento fetal, além de ser importante para tolerar o feto em desenvolvimento, uma vez que ele possui antígenos paternos (REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012). O último trimestre gestacional é caracterizado por uma resposta pró-inflamatória, sendo importante para preparar o organismo materno na contração do útero, o parto e a expulsão da placenta.

Portanto, a gravidez é um evento único onde ocorrem mudanças de perfil entre uma resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória dependendo do estágio da gestação (MOR; CARDENAS, 2011). Assim, o sucesso gestacional depende da capacidade da resposta imune materna de estabelecer uma barreira para o feto contra danos externos, e ao mesmo tempo, permitir a passagem de nutrientes para o feto em desenvolvimento (MOR et al., 2007). No entanto, um desequilíbrio nessa tolerância imunológica pode causar problemas para a gestação, como a pré-eclâmpsia e o aborto. Além disso, apesar do perfil anti-inflamatório ser importante para a tolerância materna, esse período pode favorecer uma infecção, como por exemplo, por *T. gondii*, o que pode também levar a problemas na gestação (ARRANZ-SÓLIS; MUKHOPADHYAY; SAEIJ, 2020).

1.7. Proteína 21 de *Trypanosoma cruzi*

A proteína de 21 kDa (P21) é uma proteína secretada exclusivamente por todas as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*, parasito causador da doença de Chagas, sendo importante para o mecanismo de invasão na célula hospedeira (SILVA et al., 2009), embora seu papel durante a infecção parasitária não é bem compreendido. Para caracterizar melhor as funções biológicas dessa proteína, alguns estudos foram feitos com a sua forma recombinante (rP21).

Rodrigues e colaboradores (2012) mostraram que essa proteína foi capaz de aumentar a fagocitose de macrófagos peritoneais durante a infecção por *T. cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *T. gondii*, além de remodelar o citoesqueleto de actina da célula infectada através da sua

ligação com o receptor de quimiocina do tipo 4 (CXCR4) e a via de sinalização desencadeada pela PI3-quinase (PI3K).

Para caracterizar novas atividades biológicas da rP21, Teixeira e colaboradores (2015) realizaram experimentos empregando um modelo de inflamação crônica baseado no implante de esponjas de poliéster no dorso de camundongos, as quais após o período experimental, foram removidas cirurgicamente e submetidas a análises bioquímicas e histológicas. Quanto as análises bioquímicas, foi observado que os implantes de esponja de poliéster tratadas com rP21 mostraram altos níveis N-acetilglicosaminidase (NAG), indicando que a rP21 participa da ativação de macrófagos. Além disso, a rP21 promoveu um aumento significativo na produção de mieloperoxidase (MPO), enzima expressa por neutrófilos ativados, o que evidencia a habilidade desta proteína em recrutar células imunes, como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Estes dados demonstram que a rP21 apresenta ação pró-inflamatória e elevada atividade quimiotática. Neste mesmo modelo de inflamação, a rP21 foi capaz de inibir a formação de novos vasos sanguíneos, o que foi comprovado através da diminuição do conteúdo de hemoglobina e redução no número de vasos sanguíneos em cortes histológicos.

Adicionalmente, Teixeira e colaboradores (2017) por meio de ensaios de formação de vasos em matrigel, demonstraram que a rP21 é capaz de inibir significativamente a formação de vasos através de uma interação direta com o receptor CXCR4 expresso na membrana de células endoteliais. Neste mesmo trabalho, células endoteliais tratadas com rP21 apresentaram uma modulação positiva de sFlt-1 e metaloproteinase 9 (MMP9) e regulação negativa de AFAP1, AFAP1L1, ezrina e moesina, o que poderia parcialmente explicar a atividade antiangiogênica desencadeada pela rP21. Além disso, também foi visto que a rP21 é capaz de promover um remodelamento do citoesqueleto de actina e de inibir a proliferação celular, e que esta atividade antiproliferativa da rP21 provavelmente está relacionada com uma modulação do ciclo celular.

Em adição, Teixeira e colaboradores (2019) trouxeram novos conhecimentos acerca do papel da rP21 na infecção por *T. cruzi* em modelo *in vivo* e *in vitro*. Primeiro, eles observaram que camundongos BALB/c tratados com a rP21 a cada 3 dias durante 6 semanas não induziu a produção de anticorpos, sugerindo que a proteína possui baixa imunogenicidade, não sendo capaz de induzir uma resposta humoral protetora. Adicionalmente, os autores observaram que os animais infectados com *T. cruzi* e tratados com a rP21 tiveram um tamanho aumentando dos linfonodos poplíteos e promoveu edema e resposta inflamatória no tecido cardíaco, com recrutamento de macrófagos, linfócitos e fibroblastos, sugerindo que a rP21 é importante para o processo inflamatório. Em adição, a rP21 induziu a deposição de colágeno e promoveu a

redução de vasos sanguíneos no tecido cardíaco, sugerindo que a rP21 pode levar a isquemia cardíaca. Posteriormente, os autores avaliaram o impacto dessa proteína na infecção por *T. cruzi* em tecido cardíaco, e curiosamente, a rP21 induziu uma diminuição de 50% na carga parasitária, sugerindo que a rP21 atua diretamente na proliferação do parasito durante a infecção. Para confirmar essa hipótese, os autores realizaram experimentos *in vitro* com as formas replicativas de *T. cruzi*, amastigotas intracelulares e epimastigotas. Primeiro, eles observaram que a rP21 diminuiu a proliferação de amastigotas em macrófagos. Em adição, os autores observaram que epimastigotas tratados com a rP21 apresentaram inibição do crescimento do parasito, e o resultado foi confirmado através do ciclo celular, mostrando que a rP21 promoveu uma fase G1 prolongada e a fase S diminuída.

Buscando compreender melhor os possíveis mecanismos que estariam levando a rP21 diminuir a proliferação de *T. cruzi*, Martins e colaboradores (2020) avaliaram o impacto dessa proteína também em modelo *in vitro*. Utilizando células musculares, os autores observaram que a rP21 também diminuiu a proliferação de *T. cruzi*. Para verificar os possíveis mecanismos que estariam envolvidos nessa diminuição, os autores analisaram se a rP21, assim como em estudos anteriores, estaria induzindo uma maior polimerização do citoesqueleto de actina. Corroborando com os achados de estudos anteriores (RODRIGUES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017), os autores verificaram que a rP21 também aumentou a actina, sugerindo que essa barreira física criada dentro da célula poderia estar limitando o crescimento do parasito. Em adição, os autores demonstraram possíveis mediadores inflamatórios que também poderiam estar contribuindo para o controle da proliferação de *T. cruzi*, e observaram que a rP21 induziu um aumento de NO, IFN- γ e IL-4 e diminuiu a produção de IL-10, o que poderia estar levando a morte do parasito. No entanto, ao recuperar esses amastigotas intracelulares tratados com a rP21, os autores observaram que o parasito teve a capacidade de se diferenciar em epimastigotas, mostrando que apesar da produção de mediadores inflamatórios que poderiam estar causando danos ao parasito, a sua viabilidade não foi alterada. Esses resultados sugerem que a rP21 induz mecanismos intracelulares que cria um ambiente protetor para o parasito que o faz entrar num estado de latência, fazendo com que o parasito passe despercebido pelo sistema imune hospedeiro.

Apesar dos estudos sugerirem a P21 como um futuro alvo terapêutico para o tratamento da cardiomiopatia chagásica crônica, uma das formas mais graves da doença de Chagas, recentemente um estudo mostrou essa proteína como alternativa terapêutica para o câncer de mama triplo negativo (BORGES et al., 2020). Utilizando linhagem celular de câncer de mama, os autores observaram que a rP21 tem a capacidade de se ligar as células e diminuir a expressão

de CXCR4, fazendo com que esse receptor seja internalizado, o que pode inibir a metástase do câncer. Em adição, os autores observaram que essa proteína diminuiu a capacidade de migração e invasão das células tumorais, e que essa diminuição estava relacionada com uma menor expressão de MMP9. Além disso, eles observaram que a rP21 induziu um aumento da fase G1 dessas células, sugerindo uma parada no ciclo celular. Em conclusão, os autores sugerem que devido a capacidade dessa proteína em induzir a internalização de CXCR4, e promover uma menor migração, invasão e proliferação, a rP21 pode ser um potencial alternativa terapêutica para a progressão do câncer de mama triplo negativo.

Assim, é possível verificar que a P21 é importante para desencadear a patogênese de *T. cruzi*, sendo um possível novo alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos inovadores contra a doença de Chagas, mas também pode ser uma futura estratégia terapêutica para o câncer de mama. No entanto, não se sabe o impacto da P21 na modulação da infecção por outros patógenos, como *T. gondii*, especialmente em situações de transmissão vertical, e se isso poderia levar ao agravamento ou não da toxoplasmose congênita.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é um problema de saúde pública mundial. Com isso, é importante que se tenham estudos que esclareçam os mecanismos da infecção do parasito na interface materno-fetal. Sabe-se que a P21 de *T. cruzi* é importante para os mecanismos de invasão na célula hospedeira, remodelamento do citoesqueleto de actina e indução de resposta imunológica. Porém, não existem dados na literatura que mostrem o papel dessa proteína como moduladora da infecção por *Toxoplasma gondii*, o que poderia interferir em situações de gestantes coinfectadas por *T. gondii* e *T. cruzi*, e se isso pode levar ao agravamento da transmissão vertical da toxoplasmose. Com isso, esse trabalho busca estabelecer o papel da P21 na infecção por *T. gondii*, remodelamento do citoesqueleto de actina e resposta imune em células BeWo, HTR-8/SVneo e vilos coriônicos humanos. Os resultados obtidos são importantes, pois novos conhecimentos acerca da interação parasito-hospedeiro na interface materno-fetal podem ser estabelecidos, além de entender o impacto dessa proteína na infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o papel da rP21 durante a infecção por *T. gondii* e o seu efeito na proliferação intracelular deste parasito, remodelamento do citoesqueleto de actina e resposta imune em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) e extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo), e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da rP21 na viabilidade celular em células BeWo e HTR-8/SVneo, e vilos coriônicos humanos;
- Avaliar o efeito da rP21 na invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, HTR-8/SVneo e em vilos coriônicos humanos;
- Avaliar o efeito da rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo e HTR-8/SVneo infectados ou não por *T. gondii*;
- Avaliar o efeito da rP21 na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células BeWo e HTR-8/SVneo infectados ou não por *T. gondii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo

Células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) foram adquiridas do “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Manassas, VA, EUA). As células trofoblásticas humanas extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) foram cedidas pela professora Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil). Ambas as células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014; SILVA et al., 2017). De acordo com o Comunicado Nº13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP) declara que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo 1).

4.2. Coleta de placentas humanas

Placentas humanas a termo (n=2) foram adquiridas de pacientes gestantes após o parto cesárea (36 a 40 semanas de gestação) no Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU). As placentas foram coletadas de pacientes que não apresentaram pré-eclâmpsia, doenças infecciosas incluindo toxoplasmose, doenças cardíacas, diabetes e outras manifestações clínicas que poderiam intervir nos resultados esperados.

Após a coleta, a placenta foi encaminhada imediatamente para o laboratório e lavada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril para a remoção do excesso de sangue, seguido de dissecação para remoção do tecido endometrial e a membrana fetal em até 1 h após a coleta. Os vilos placentários terminais flutuantes (volume aproximado de 10 mm³) foram posteriormente colocados em placas de 96 poços (um por poço) e cultivados em meio RPMI suplementado com SFB a 10% e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) durante 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ para posteriores infecção e tratamento (SILVA et al., 2017).

O presente protocolo de pesquisa com amostras de tecido humano foi realizado de acordo com as diretrizes e regulamentações pertinentes, e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil, com o número de aprovação 3.679.426 (Anexo 2). Um termo de consentimento foi obtido de todos os sujeitos, e quando os sujeitos eram menores de 18 anos, o termo foi obtido por um dos pais e/ou

responsável. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes e/ou seus responsáveis legais.

4.3. Manutenção de *T. gondii*

Taquizoítas de *T. gondii*, clone 2F1, que são derivados da cepa altamente virulenta RH e que expressam constitutivamente o gene da β -galactosidase, foram cedidos pelo Professor Dr. Vern Carruthers, da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Taquizoítas foram propagados em células BeWo mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37 °C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014).

4.4. Purificação da rP21

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 foram transfectadas com o plasmídeo pET-28a(+) que apresenta o gene que codifica a P21 (GenBank: EU004210.1). Para o pré-inóculo, 150 μ L dessas bactérias foram adicionados em um erlenmayer contendo 50 mL de meio Luria-Bertani (LB) com o antibiótico de seleção Kanamicina (50 μ g/mL). O pré-inóculo foi mantido sob agitação por 18 h a 37 °C. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado a um frasco contendo 2000 mL de meio LB e Kanamicina (50 μ g/mL), e incubado a 37 °C sob agitação até atingir a densidade óptica (DO) em torno de 0,5 a 0,9. Em seguida, foi adicionado 0,5mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), objetivando estimular a produção da proteína recombinante. Após 3 h de incubação, a solução foi centrifugada à 10.000 rpm por 20 min à 4 °C, e o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado de bactérias foi dissolvido em PBS 1x.

Para promover a lise bacteriana, foi acrescentado lisozima (0,25 μ g/mL) ao material ressuspensionado por 15 min, e após esse tempo, o lisado bacteriano foi sonificado usando o Sonicador Branson Sonifier 450, durante 20 ciclos de 1 min com 30 seg de intervalo entre os ciclos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em solução tampão de ureia 9M.

A amostra foi incubada com uma coluna de níquel e deixada por 2 h sob agitação a 4 °C. A rP21 possui uma cauda de histidina que tem afinidade pelo níquel, ficando aderida a coluna. Em seguida, a coluna foi submetida a algumas etapas para a captura da rP21: (1) três centrifugações à 2000 rpm em tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M) com posterior descarte do sobrenadante; (2) três centrifugações à 2000 rpm em tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M) com posterior descarte do sobrenadante; e (3) quatro centrifugações à 2000 rpm com

tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M) com posterior recolhimento do sobrenadante, pois nele está a proteína eluída. Os tampões utilizados nessa etapa possuem concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M, respectivamente) pois ele possui uma maior afinidade pela coluna de níquel do que a cauda de histidina presente na proteína recombinante, permitindo assim a liberação da rP21 no sobrenadante.

O material eluído foi dialisado em PBS 1x com uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/131198) por 48 h sob agitação contínua a 4 °C para a purificação da proteína dos resíduos de ureia e promover o renovelamento proteico. A solução de PBS 1x foi reposta após o primeiro dia de diálise. Em seguida, a proteína foi incubada por 15 minutos com resina de polimixicina B para a retirada de endotoxinas de LPS (OLIVEIRA, 2018). Para verificar a presença e a pureza da rP21, foi realizado um gel SDS-PAGE 13% com posterior coloração com Coomassie Blue (Figura suplementar 1), e a concentração da proteína foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1979) (SILVA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2014; MARTINS et al., 2020).

4.5. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células BeWo e HTR-8/SVneo frente ao tratamento com a rP21 foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Células BeWo (3×10^4 /200 μ l) e HTR-8/SVneo (2×10^4 /200 μ l) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com a rP21 (40 e 80 μ g/mL) em meio a 10% de SFB em duas condições experimentais: (I) um grupo foi tratado durante 24 h; e o outro grupo (II) foi tratado durante 48 h, com reposição da rP21 após as primeiras 24 h de tratamento. As concentrações utilizadas da rP21 foram baseadas em estudos prévios (RODRIGUES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019; BORGES et al., 2020; MARTINS et al., 2020). Como controle, as células foram tratadas somente com meio 10% de SFB sem adição da rP21 (meio).

Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80 °C para posterior dosagem de citocinas. As células foram incubadas com 10 μ l de MTT (5 mg/mL) acrescido de 90 μ L de meio a 10% de SFB em estufa durante 4 h. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μ L de solução contendo SDS a 10% e N, N-dimetil formamida a 50%. Após 30 min de incubação, foi obtida a densidade

óptica a 570 nm em leitor de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e os resultados foram expressos como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação ao controle não tratado (100% de viabilidade). Foi realizado um experimento em sextuplicata.

4.6. Ensaio de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo

A invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo frente ao tratamento com a rP21 foram verificadas através do ensaio de β -galactosidase (SILVA et al., 2017). Para a realização desses ensaios, foram utilizados cinco protocolos experimentais distintos: (I) infecção e tratamento simultâneo com a rP21 por 1 h, 2 h e 3 h (invasão); (II) tratamento após 3 h de infecção (proliferação); (III) pré-tratamento das células com a rP21 por 24 h (invasão e proliferação); (IV) ensaio de reinfecção (invasão e proliferação); e (V) ensaio de reversibilidade (proliferação).

4.6.1. Infecção e tratamento simultâneo com a rP21 (invasão)

Células BeWo (3×10^4 /200 μ l) e HTR-8/SVneo (2×10^4 /200 μ l) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) na presença de rP21 (40 e 80 μ g/mL) em meio com 2% de SFB em uma cinética de tempo (1 h, 2 h e 3 h). Como controle, as células foram infectadas e não tratadas (meio infectado). Após cada tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram submetidas ao ensaio de β -galactosidase.

Brevemente, as placas foram centrifugadas e em seguida foram adicionados às células 100 μ L de tampão de lise RIPA por 15 min (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7.5), 160 μ L de tampão de ensaio (100 mM de tampão fosfato, pH 7,3, 102 mM de β -mercaptoetanol, 9 mM de MgCl₂) e 40 μ L do substrato CPRG (*clorofenol red- β -D-galactopiranosídeo*; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570 nm usando leitor de placas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Foi construída uma curva padrão por meio de diluições seriadas, em duplicata de taquizoítas de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a 1×10^6 /poço/50 μ L. Foram adicionados na curva padrão as soluções de tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato

CPRG e a densidade óptica foi mensurada. Os dados foram apresentados como % de invasão de *T. gondii* em relação ao controle apenas infectado (100% de invasão). Para o ensaio de invasão por 3 h, foi realizado um experimento com oito replicatas, enquanto que o ensaio de cinética de tempo foi realizado em quintuplicata.

4.6.2. Tratamento após 3 h de infecção (proliferação)

Células BeWo ($3 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) e HTR-8/SVneo ($2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio 10% por adicionais 24 h. Como controle, as células foram infectadas e não tratadas (meio infectado). Após o tempo de 24 h, o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80 °C para posterior dosagem de citocinas, e as células foram submetidas ao ensaio de β -galactosidase, como já descrito anteriormente. Foram realizados quatro experimentos independentes em sextuplicata.

4.6.3. Pré-tratamento das células com a rP21 por 24 h (invasão e proliferação)

Células BeWo ($3 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) e HTR-8/SVneo ($2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio 10% de SFB por adicionais 24 h. Após o tempo, o tratamento foi retirado, e as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e uma placa foi submetida ao ensaio de invasão, e na outra placa foi adicionado meio com 10% de SFB por adicionais 24 h para análise da proliferação, ambos pelo ensaio de β -galactosidase. Como controle, as células não foram pré-tratadas com a rP21, apenas infectadas (meio infectado). Foram realizados três experimentos independentes em sextuplicata.

4.6.4. Ensaio de reinfecção (invasão e proliferação)

Células BeWo ($1 \times 10^6/2000 \mu\text{l}$) e HTR-8/SVneo ($1 \times 10^6/2000 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 6 poços em meio com 10% SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h

em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio com 10% de SFB por adicionais 24 h. Como controle, as células foram infectadas e não tratadas (meio infectado). Após o tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados duas vezes com meio sem SFB para retirada de parasitos extracelulares, e os parasitos intracelulares foram isolados por 10 passagens mecânicas através de seringas acopladas com agulhas de calibre 21 e 26 gauges, respectivamente. O lisado foi centrifugado à 1500 rpm por 30 sec para a remoção de debris celulares, e os parasitos isolados de cada condição experimental foram então usados para reinfectar novas células BeWo e HTR-8/SVneo que foram previamente plaqueadas em placas de 96 poços ($3 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ e $2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$, respectivamente) na proporção 3:1 em meio com 2% de SFB. Após 3 h de infecção, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e uma placa foi submetida ao ensaio de invasão, e na outra placa foi adicionado meio com 10% de SFB por adicionais 24 h para análise da proliferação, ambos pelo ensaio de β -galactosidase. Como controle, as células foram infectadas com parasitos provenientes de células que não foram tratadas com rP21 (meio infectado). Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas.

4.6.5. Ensaio de reversibilidade (proliferação)

Células BeWo ($3 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) e HTR-8/SVneo ($2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO_2 . Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio 10% por adicionais 24 h, e após o tempo, três condições experimentais distintas foram avaliadas: (I) após 24 h de tratamento, um grupo foi submetido ao ensaio de β -galactosidase (24 h de tratamento); (II) após 24 h, outro grupo teve o tratamento removido e adicionado meio com 10% de SFB por mais 24 h (24 h após a remoção do tratamento); e (III) e após 24 h, outro grupo foi tratado novamente com a rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) por mais 24 h (48 h de tratamento), e após o tempo dos dois últimos grupos (II e III), estes foram submetidos ao ensaio de β -galactosidase. Como controle, as células foram infectadas e não tratadas (meio infectado). Foram realizados três experimentos independentes em sextuplicata.

4.7. Análise da polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo e HTR-8/SVneo

Células BeWo ($1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$) e HTR-8/SVneo ($6 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares (13 mm) em meio com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e as células foram tratadas ou não com rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio 10% por adicionais 24 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as lamínulas foram lavadas uma vez com PBS 1x e fixadas com formaldeído 4% por 40 min. Após o tempo, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x, e posteriormente incubadas overnight com anticorpo primário monoclonal feito em mouse anti-*T.gondii* (SAG1/p30) (Abcam TP3 #ab8313) (diluído 1:500 em PGN-saponina 0,01%). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x, e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA, #A11001) (diluído 1:500 em PGN-saponina 0,01%), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) conjugado com faloidina (Sigma, P1951) (diluído 1:50 em PGN-saponina 0,01%) e TO-PRO-3 (Life Technologies) (diluído 1:450 em PGN-saponina 0,01%) por 1 h no escuro em temperatura ambiente para marcação de taquizoítas de *T. gondii*, actina e núcleos, respectivamente. Após o tempo, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x e montadas em lâminas com glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente *anti-fading*). As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) com um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 200 M). Um total de 100 células em triplicata de cada condição foram analisadas quanto a intensidade média de fluorescência da actina no software Image J versão 1.50i (National Institutes of Health, EUA). Como controle, as células foram não infectadas e não tratadas (meio não infectado) ou infectadas e não tratadas (meio infectado). Foi realizado um experimento em triplicata.

4.8. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo e HTR-8/SVneo

Células BeWo ($1 \times 10^5/500 \mu\text{l}$) e HTR-8/SVneo ($8 \times 10^4/500 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e as células foram tratadas ou não com rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio 10% por adicionais 24 h. Em seguida, as células

foram colhidas dos poços, centrifugadas à 1500 rpm por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 100 µl com a sonda ROS, (2',7' diacetato de diclorofluoresceína - H₂DCFDA) (10 µM diluído em PBS 1x com 10% de SFB) (Sigma Aldrich) por 45 min à 37 °C e 5% de CO₂ no escuro. Como controle positivo de indução de ROS, células BeWo e HTR-8/SVneo foram tratadas previamente à incubação com 5% de H₂O₂ (diluído em PBS 1x) por 30 min. Após o tempo, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em PBS 1x com 10% de SFB. A intensidade média de fluorescência de H₂DCFDA foi detectada em 15.000 células de cada grupo e analisada pelo citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter, EUA). Foram realizados dois experimentos independentes em quintuplicata.

4.9. Dosagem de citocinas por ELISA indireto

As citocinas humanas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e MIF foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura de células BeWo e HTR-8/SVneo. As dosagens destas citocinas nos sobrenadantes foram realizadas usando o teste imunoenzimático ELISA, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA; R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 (BD Biosciences) *overnight* a 4 °C e anti-MIF (R&D Systems) *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS Tween 0,05% para posterior bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS a 10% de SFB (IL 4, IL-6, IL-8, IL-10) e PBS a 1% de soro albumina bovina (BSA) para MIF. Após 1 h, as placas foram novamente lavadas, e as amostras e a curva padrão foram adicionadas e incubadas por mais 2 h a temperatura ambiente. As placas foram submetidas a consecutivas lavagens e em seguida os anticorpos de detecção anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 conjugados com estreptavidina acoplada a peroxidase foram acrescentados ao sistema por adicionais 1 h; e anti-MIF por 2 h, todos em temperatura ambiente. Para MIF, as placas foram lavadas, e foi adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por mais 20 min. Por fim, as placas foram lavadas e foi acrescentado 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) para a detecção dos imunocomplexos. Após a placa revelar, foi adicionado H₂SO₄ para parar a reação. A leitura da placa foi realizada em uma leitora de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) a 450 nm. Os dados foram demonstrados em pg/mL de acordo com a curva padrão. Três experimentos independentes em triplicata foram realizados.

Limites de detecção para cada citocina: IL-4: 7,81 pg/mL; IL-6: 4,7 pg/mL; IL-8: 3,125 pg/mL, IL-10: 7,81 pg/mL e MIF: 31,25 pg/mL.

4.10. Viabilidade de vilos coriônicos humanos tratados com rP21

Os vilos coriônicos humanos foram coletados conforme descrito no item 4.2 e cultivados em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram tratados com rP21 (40 e 80 µg/mL) em meio com 10% de SFB em duas condições experimentais: (I) um grupo foi tratado durante 24 h; e o outro grupo (II) foi tratado durante 48 h, com reposição da rP21 após as primeiras 24 h de tratamento. Como controle, os vilos foram tratados apenas com meio com 10% de SFB (meio).

Após o tempo de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à - 80 °C para posterior dosagem de citocinas. Os vilos foram incubadas com 20 µL de MTT (5 mg/mL) acrescido de 180 µL de meio a 10% de SFB em estufa durante 4 h. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de solução contendo SDS a 10% e HCl (0,01M) overnight. Os vilos foram removidos de cada poço e a densidade óptica foi feita a 570 nm em leitor de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e os resultados foram expressos como % de vilos viáveis (% de viabilidade dos vilos) em relação aos vilos não tratados (100% de viabilidade) (TEIXEIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2021). Foi realizado um experimento em quintuplicata.

Adicionalmente, para verificar a integridade do vilos tratados com a rP21, eles foram coletados para análise morfológica usando coloração com hematoxilina e eosina (SILVA et al., 2017; FRANCO et al., 2019).

4.11. Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos

A proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos tratados ou não com a rP21 foi verificada através do ensaio de β-galactosidase (SILVA et al., 2017). Para a realização desse ensaio, foram utilizados dois protocolos experimentais distintos: (I) ensaio de reversibilidade; e (II) pré-tratamento dos vilos com a rP21 por 24 h.

(I) Ensaio de reversibilidade: Os vilos coriônicos humanos foram cultivados em placas de 96 poços por 24 h em meio com 10% de SFB a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram infectados com *T. gondii* na proporção de 1×10^6 parasitos para cada poço em meio com 10% de SFB por 24 h. Em seguida, os vilos foram tratados com a rP21 (40 e 80 µg/mL) em meio com 10% de SFB por mais 24 h. Após o tempo, três condições experimentais distintas

foram avaliadas: (I) após 24 h de tratamento, um grupo de vilos foram coletados para posterior análise de proliferação pelo ensaio de β -galactosidase (24 h de tratamento); (II) após 24 h, outro grupo de vilos tiveram o tratamento removido e adicionado meio com 10% de SFB por mais 24 h (24 h após a remoção do tratamento); e (III) após 24 h, outro grupo de vilos foram tratados novamente com a rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) por mais 24 h (48 h de tratamento), e após o tempo dos dois últimos grupos (II e III), os vilos foram coletados para análise pelo ensaio de β -galactosidase. Como controle, os vilos foram infectados e não tratados (meio infectado). Foram realizados dois experimentos independentes em quintuplicata

(II) Pré-tratamento por 24 h: Os vilos coriônicos humanos foram cultivados em placas de 96 poços por 24 h em meio com 10% de SFB a 37 °C e 5% de CO_2 . Em seguida, os vilos foram tratados com a rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em meio com 10% de SFB por 24 h. Posteriormente, o tratamento foi retirado, e os vilos foram infectados com *T. gondii* na proporção de 1×10^6 parasitos para cada poço em meio com 10% de SFB por mais 24 h. Após o tempo, os vilos foram coletados para posterior análise pelo ensaio de β -galactosidase. Foram realizados dois experimentos independentes em sextuplicata.

A proliferação intracelular de *T. gondii* em amostras de vilos coriônicos humanos foi realizada pela adição de 150 μL de tampão RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 1% (p/v) e 0,1% (p/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] suplementado com coquetel inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) para cada vilo e homogeneizando as amostras em gelo para extração de proteínas. O homogenato foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para medir a proteína total ($\mu\text{g/mL}$) usando o ensaio de Bradford. Aliquotas de 20 μL de cada amostra foram usadas para determinar a proliferação intracelular de *T. gondii* pelo ensaio de β -galactosidase, como já descrito anteriormente. Os dados do número de parasitos foram normalizados de acordo com a concentração de proteína de cada vilo, mostrando o número de taquizoítas por μg de tecido. Os dados foram expressos como % de proliferação intracelular de *T. gondii*: o número médio de taquizoítas dos controles (vilos infectados e não tratados) correspondeu a 100% da proliferação do parasito, e o número de taquizoítas de cada condição de tratamento foi transformado em porcentagem de acordo com 100% de proliferação do parasito do controle.

4.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism Software versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média

$\pm$ erro padrão da média (SEM). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Sidak para os dados paramétricos ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn para dados não paramétricos. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. A rP21 não diminui a viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo

O ensaio de MTT foi realizado para avaliar uma possível citotoxicidade da rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em células BeWo e HTR-8/SVneo (Fig. 1).

Nós observamos que a rP21 não alterou a viabilidade celular em nenhuma concentração quando comparado com às células não tratadas (meio), independentemente do tipo celular (Fig. 1A-B).

5.2. A rP21 aumenta a invasão de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo

O ensaio de β -galactosidase foi realizado para avaliar se a infecção por *T. gondii* juntamente com a rP21 altera a invasão em células BeWo e HTR-8/SVneo (Fig. 2).

Nós observamos que a infecção concomitante ao tratamento com a rP21 aumentou a invasão (3 h) de *T. gondii* nas duas concentrações utilizadas em relação às células apenas infectadas (meio infectado) em células BeWo (40 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,029$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,0137$) e HTR-8/SVneo (40 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,0307$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^{****}P < 0,0001$) (Fig. 2A-B).

Em adição, nós avaliamos se o mesmo fenômeno aconteceria em tempos menores de invasão (1 e 2 h) (Fig. suplementar 2). Apesar de não ter dado diferença estatística nos tempos de 1 e 2 h, com exceção na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em células HTR-8/SVneo (1 h de infecção; $^*P = 0,0110$), nós observamos uma tendência de maior invasão nos dois tipos celulares quando a rP21 está presente em relação às células apenas infectadas (meio infectado). Em adição, nós observamos novamente uma maior invasão de *T. gondii* no tempo de 3 h em células BeWo (40 $\mu\text{g/mL}$: $^{**}P = 0,0021$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^*P < 0,0344$) e HTR-8/SVneo (40 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,0280$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^*P < 0,0212$) (Fig. suplementar 2A-B).

Para análise de invasão de experimentos posteriores, nós escolhemos o tempo de 3 h.

5.3. A rP21 diminui a proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo

O ensaio de β -galactosidase também foi realizado para avaliar se a rP21 altera a proliferação intracelular de *T. gondii* com posterior tratamento com a rP21 em células BeWo e HTR-8/SVneo (Fig. 3).

Nós observamos que o tratamento com as duas concentrações da rP21 diminuiu a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo (40 µg/mL: *** $P = 0,0008$; 80 µg/mL: **** $P < 0,0001$) e HTR-8/SVneo (40 µg/mL: ** $P = 0,0016$; 80 µg/mL: **** $P < 0,0001$) em relação às células apenas infectadas (meio infectado) (Fig. 3A-B).

Imagens representativas de células BeWo (Fig. 3C-E) e HTR-8/SVneo (Fig. 3F-H) são evidenciadas, onde é possível observar um grande número de taquizoítas de *T. gondii* em células infectadas e não tratadas (C e F) em relação às células infectadas e tratadas com rP21 40 µg/mL (D e G) e 80 µg/mL (E e H).

5.4. O pré-tratamento com a rP21 por 24 h aumenta a invasão de *T. gondii* em células BeWo e diminui a proliferação em células BeWo e HTR-8/SVneo

Para avaliar se o pré-tratamento de células BeWo e HTR-8/SVneo com a rP21 altera a invasão e proliferação de *T. gondii*, nós também realizamos o ensaio de β-galactosidase (Fig. 4).

Nós observamos que apenas células BeWo pré-tratadas com 40 µg/mL de rP21 aumentou a invasão de *T. gondii* em relação às células apenas infectadas (meio infectado) (**** $P < 0,0001$) (Fig. 4A). Por outro lado, o pré-tratamento com as duas concentrações da rP21 diminuiu a proliferação de *T. gondii* em células BeWo (40 µg/mL: ** $P = 0,0085$; 80 µg/mL: ** $P = 0,0024$) e HTR-8/SVneo (40 µg/mL: * $P = 0,0396$; 80 µg/mL: *** $P = 0,0002$) em relação às células apenas infectadas (meio infectado) (Fig. 4C-D).

5.5. A rP21 não altera a infectividade de *T. gondii*, permitindo uma maior capacidade de reinfecção em células BeWo, mas diminuindo a proliferação em células BeWo e HTR-8/SVneo

Para avaliar se a rP21 altera a viabilidade de *T. gondii*, nós retiramos os parasitos de células tratadas ou não, colocamos para reinfetar novas células e avaliamos a invasão e proliferação pelo ensaio de β-galactosidase (Fig. 5).

Nós observamos que apenas parasitos provenientes de células BeWo tratadas com 40 µg/mL de rP21 tiveram uma maior capacidade de invasão em relação às células apenas infectadas (meio infectado) (*** $P = 0,0003$) (Fig. 5A). Por outro lado, parasitos provenientes de células BeWo (40 µg/mL: * $P = 0,0426$; 80 µg/mL: ** $P = 0,0031$) e HTR-8/SVneo (40 µg/mL: * $P = 0,02$; 80 µg/mL: *** $P = 0,0009$) tratadas com as duas concentrações da rP21, ao entrarem nas células tiveram uma menor proliferação em relação às células apenas infectadas (meio infectado) (Fig. 5C,D).

5.6. A remoção da rP21 tende a reverter o efeito da proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo

Para avaliar se a remoção da rP21 reverteria o efeito da proliferação de *T. gondii*, nós retiramos o tratamento após 24 h, e deixamos por mais 24 h em meio com 10% de SFB ou com rP21 em células BeWo e HTR-8/SVneo (Fig. 6).

Confirmando os resultados anteriores, nós observamos que o tratamento com as duas concentrações da rP21 diminuíram a proliferação de *T. gondii* em 24 h em células BeWo (40 µg/mL: $^{**}P = 0,0021$; 80 µg/mL: $^{*}P = 0,0133$) e HTR-8/SVneo (40 µg/mL: $^{*}P = 0,05$; 80 µg/mL: $^{*}P = 0,0101$) em relação às células apenas infectadas por 24 h (meio infectado) (Fig. 6A,B). Em adição, nós observamos que o tratamento com ambas concentrações da rP21 por 48 h também diminuíram a proliferação de *T. gondii* em células BeWo (40 µg/mL: $^{*}P = 0,0466$; 80 µg/mL: $^{*}P = 0,0294$) e HTR-8/SVneo (40 µg/mL: $^{*}P = 0,0341$; 80 µg/mL: $^{**}P = 0,0017$) em relação às células apenas infectadas por 48 h (meio infectado) (Fig. 6A,B). Por outro lado, apesar de ter uma tendência na diminuição da proliferação, os grupos em que a rP21 foi removida após 24 h não apresentaram diferença estatística na proliferação em relação às células apenas infectadas por 48 h (meio infectado), tanto em células BeWo quanto em HTR-8/SVneo (Fig. 6A,B).

5.7. A rP21 induz a polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo, mas não em HTR-8/SVneo

Para avaliar a polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo e HTR-8/SVneo, nós analisamos as células em microscópio confocal (Fig. 7).

Nas células BeWo, nós observamos que células não infectadas e tratadas com as duas concentrações da rP21 aumentaram a polimerização da actina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado, 40 e 80 µg/mL: $^{****}P < 0,0001$). Em adição, células apenas infectadas ou infectadas e tratadas com 40 µg/mL também induziram um aumento na polimerização de actina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado, $^{****}P < 0,0001$). Por outro lado, células infectadas e tratadas com 80 µg/mL da rP21 diminuíram a polimerização da actina em relação às células infectadas (meio infectado, $^{####}P < 0,0001$) e células não infectadas e tratadas com a mesma concentração ($^{&&&&}P < 0,0001$) (Fig. 7A).

Em relação às células HTR-8/SVneo, nós observamos que células não infectadas e tratadas com 40 µg/mL da rP21 diminuíram a polimerização da actina em relação às células

não tratadas (meio não infectado, **** $P < 0,0001$). Por outro lado, células infectadas e tratadas com 40 µg/mL da rP21 aumentaram a polimerização da actina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado, **** $P < 0,0001$), células não infectadas e tratadas com a mesma concentração (&&&& $P < 0,0001$) e células apenas infectadas (meio infectado, ## $P = 0,0051$) (Fig. 7B).

Imagens representativas de células BeWo (Fig. 7C-H) e HTR-8/SVneo (Fig. 7I-N) são evidenciadas, onde é possível observar a marcação da actina (vermelho), *T. gondii* (verde) e núcleo (azul) em células não infectadas e não tratadas (C e I), tratadas com rP21 40 µg/mL (D e J), 80 µg/mL (E e K), células apenas infectadas (F e L), infectadas e tratadas com rP21 40 µg/mL (G e M) e 80 µg/mL (H e N).

5.8. A rP21 tende a diminuir a produção de ROS em células BeWo e diminui em HTR-8/SVneo

A produção de ROS em células BeWo e HTR-8/SVneo foi avaliada através da mensuração de H₂DCFDA por citometria de fluxo (Fig. 8).

Em células BeWo, nós observamos que células apenas infectadas (*** $P = 0,0008$) ou infectadas e tratadas com 40 µg/mL de rP21 (** $P = 0,0059$) induziram uma maior produção de ROS em relação às células não infectadas (meio não infectado). Em adição, células infectadas e tratadas com 40 µg/mL de rP21 induziram uma maior produção de ROS em relação às células não infectadas e tratadas com a mesma concentração da rP21 (& $P = 0,0136$) (Fig. 8A).

Em relação às células HTR-8/SVneo, nós observamos que células apenas infectadas induziram uma maior produção de ROS em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado, * $P = 0,0264$). No entanto, células infectadas e tratadas com 40 (# $P = 0,0175$) ou 80 µg/mL de rP21 (## $P = 0,0037$) diminuíram a produção de ROS em relação às células apenas infectadas (meio infectado) (Fig. 8B).

5.9. A rP21 tende a induzir uma maior produção de MIF e diminui a produção de IL-8 em células BeWo

Os sobrenadantes das diferentes condições de células BeWo foram submetidos ao ensaio de ELISA para verificar o perfil de citocinas secretados (Fig. 9).

Nas células BeWo, nós observamos que células apenas infectadas (**** $P < 0,0001$) ou infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 (40 µg/mL: **** $P < 0,0001$; 80 µg/mL: ** $P = 0,0034$) induziram uma maior produção de MIF em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado). Em adição, células infectadas e tratadas com ambas

concentrações da rP21 tiveram uma maior produção dessa citocina em relação às células não infectadas e tratadas com a mesma concentração (40 µg/mL: $***P < 0,0001$; 80 µg/mL: $**P = 0,0062$) (Fig. 9A).

Em relação à IL-6, nós observamos que células apenas infectadas ou infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 induziram uma maior produção dessa citocina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado, $***P < 0,0001$). Em adição, células infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 tiveram uma maior produção de IL-6 em relação às células não infectadas e tratadas com a mesma concentração ($***P < 0,0001$) (Fig. 9B).

Em relação à produção de IL-8, nós observamos que células não infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 (40 µg/mL: $**P < 0,0041$; 80 µg/mL: $***P = 0,0009$), ou células apenas infectadas ($***P < 0,0001$) ou infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 ($***P < 0,0001$) diminuíram a produção dessa citocina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado). Em adição, células infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 tiveram uma menor produção de IL-8 em relação às células não infectadas e tratadas com a mesma concentração (40 µg/mL: $**P = 0,0043$; 80 µg/mL: $**P = 0,0041$) (Fig. 9C).

As citocinas IL-4 e IL-10 não apresentaram diferenças entre os grupos (dados não mostrados).

5.10. A rP21 induz uma menor produção de MIF e aumenta a produção de IL-6 em células HTR-8/SVneo

Os sobrenadantes das diferentes condições de células HTR-8/SVneo foram submetidos ao ensaio de ELISA para verificar o perfil de citocinas secretados (Fig. 10).

Em relação à produção de MIF, nós observamos que células apenas infectadas aumentaram a produção dessa citocina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado, $*P = 0,0325$). No entanto, células infectadas e tratadas com 40 µg/mL da rP21 diminuíram a produção de MIF em relação às células somente infectadas (meio infectado, $#P = 0,0312$) (Fig 10A).

Em relação à produção de IL-6, nós observamos que células apenas infectadas ($*P = 0,0266$) ou infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 (40 µg/mL: $**P = 0,0059$; 80 µg/mL: $***P = 0,0002$) induziram uma maior produção dessa citocina em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado). Em adição, células infectadas e tratadas com 80 µg/mL da rP21 tiveram uma maior produção de IL-6 em relação às células somente

infectadas (meio infectado, $^{\#}P = 0,0455$). Além disso, células infectadas e tratadas com ambas as concentrações da rP21 tiveram uma maior produção dessa citocina em relação às células não infectadas e tratadas com as mesmas concentrações (40 $\mu\text{g/mL}$: $^{\&\&}P = 0,0023$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^{\&\&\&}P < 0,0001$) (Fig. 10B).

Em relação à IL-10, nós observamos que não houve diferença significativa entre os grupos, apesar de ter uma tendência de maior produção dessa citocina em células infectadas e tratadas com ambas concentrações da rP21 em relação às células somente infectadas (meio infectado) (Fig. 10C).

As citocinas IL-4 e IL-8 não apresentarem diferenças entre os grupos (dados não mostrados).

5.11. A rP21 não altera a viabilidade e aumenta a proliferação de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos

Para avaliar a viabilidade dos vilos coriônicos humanos tratados com a rP21 por 24 e 48 h, nós realizamos o ensaio de MTT (Fig. 11). Nós observamos que ambas as doses da rP21 nos dois tempos não diminuíram a viabilidade dos vilos em relação aos vilos não tratados (meio) (Fig. 11A). Fotomicrografias representativas de vilos não tratados por 24 e 48h (Fig. 11B, E), ou tratados com 40 $\mu\text{g/mL}$ de rP21 por 24 e 48 h (Fig. 11C, F) ou 80 $\mu\text{g/mL}$ por 24 e 48 h (Fig. 11D, G), onde é possível observar a morfologia do sinciciotrofoblasto (seta) e mesênquima (M) preservados quando comparados aos vilos não tratados (meio).

Posteriormente, nós avaliamos se o tratamento com a rP21 modularia a proliferação de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos pelo ensaio de β -galactosidase (Fig. 12). Primeiramente, nós observamos que o tratamento com ambas as concentrações da rP21 por 24 h pós infecção aumentou a proliferação de *T. gondii* em relação aos vilos somente infectados por 24 h (meio infectado, 40 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,036$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,032$). Nós observamos que os grupos que tiveram a remoção da rP21 após 24 h tiveram efeito semelhante em relação aos vilos somente infectados por 48 h (meio infectado, 40 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,0227$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^{**}P = 0,0024$). Em adição, os grupos que foram tratados por 48 h com ambas as concentrações da rP21 também tiveram maior proliferação de *T. gondii* em relação aos vilos somente infectados por 48 h (meio infectado, 40 $\mu\text{g/mL}$: $^{**}P = 0,0039$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,0386$) (Fig. 12A).

Nós também observamos que vilos pré-tratados com a rP21 por 24 h também apresentaram uma maior proliferação de *T. gondii* em relação aos vilos somente infectados (meio infectado, 40 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,0229$; 80 $\mu\text{g/mL}$: $^*P = 0,039$) (Fig 12B).

6. DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, o papel da P21 tem sido elucidado a fim de entender quais mecanismos celulares induzidos por essa proteína que favorecem o estabelecimento da infecção por *T. cruzi*, contribuindo para a patogênese da doença de Chagas. Em adição, essa proteína se mostrou como uma molécula promissora no tratamento do câncer de mama triplo negativo. No entanto, o papel da P21 na infecção por outros patógenos não é conhecido, uma vez que essa proteína pode apresentar efeitos em situações de coinfeção. Nesse sentido, utilizando modelos de estudos da interface materno-fetal, nós buscamos entender o papel dessa proteína na infecção causada por *T. gondii* no contexto da toxoplasmose congênita, uma situação que pode ocorrer em gestantes que estão coinfectadas por *T. cruzi* e por *T. gondii*.

Inicialmente, nós verificamos o efeito da rP21 na viabilidade de células BeWo e HTR-8/SVneo. Nós observamos que ambas concentrações da proteína não foram capazes de reduzir a viabilidade nas duas linhagens celulares. Esses resultados corroboram com estudos anteriores, onde a rP21 não reduziu a viabilidade de células endoteliais, células tumorais humanas, macrófagos imortalizados e mioblastos murinos (TEIXEIRA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019; BORGES et al., 2020; MARTINS et al., 2020).

Em seguida, nós avaliamos o papel dessa proteína na infecção por *T. gondii*. Estudos demonstram que a rP21 é importante para uma maior invasão de *Trypanosoma cruzi* em células epiteliais uterinas humana (Hela) (SILVA et al., 2009). Nesse sentido, nós avaliamos se a rP21 promoveria o mesmo efeito na invasão de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo. Nós observamos que a infecção concomitante ao tratamento com a rP21 foi capaz de aumentar a invasão de *T. gondii* em uma cinética de tempo (1, 2 e 3h). Nossos resultados corroboram com um estudo anterior, onde foi demonstrado que a rP21 aumentou a invasão não só de *T. cruzi*, mas também de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Toxoplasma gondii* em macrófagos peritoneais (RODRIGUES et al., 2012). Essa maior capacidade invasiva pode ser explicada pela ligação da rP21 ao seu receptor CXCR4 na célula hospedeira, promovendo uma maior capacidade fagocítica (RODRIGUES et al., 2012). Esse receptor é expresso tanto em células BeWo quanto em HTR-8/SVneo (ISHI et al., 2000; DOLCINI et al., 2003; WU et al., 2019; XIAO et al. 2020), no entanto, experimentos futuros são necessários para avaliar se a rP21 é capaz de induzir uma maior expressão de CXCR4 nas duas linhagens celulares.

Após verificarmos que a rP21 aumenta a invasão de *T. gondii*, nós avaliamos o impacto dessa proteína na proliferação intracelular do parasito em células BeWo e HTR-8/SVneo. Primeiramente, nós avaliamos a proliferação do parasito numa situação em que ele já está presente na célula e a rP21 entraria no organismo posteriormente. Nossos resultados

demonstram que o tratamento com a rP21 após 3 h de infecção foi capaz de diminuir a proliferação de *T. gondii* nas duas linhagens celulares. Estudos demonstram que a rP21 diminuiu a proliferação de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos imortalizados e mioblastos murinos (TEIXEIRA et al., 2019; MARTINS et al., 2020). Na infecção por *T. cruzi*, essa diminuição da proliferação promovido pela rP21 é importante para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, uma vez que ele pode ficar confinado dentro da célula e passar despercebido pelo sistema imune hospedeiro, possivelmente atingindo um estado de latência. No entanto, no contexto da infecção por *T. gondii*, nós não sabemos se a rP21 pode ter um efeito semelhante, o que contribuiria também para a sua sobrevivência no hospedeiro.

Posteriormente, nós avaliamos a invasão e proliferação de *T. gondii* em uma situação onde a rP21 já estaria no organismo e entrado em contato prévio com a célula hospedeira antes da infecção. Nessa condição experimental, nós observamos que apenas a concentração de 40 µg/mL da rP21 aumentou a invasão de *T. gondii* em células BeWo. Nós hipotetizamos que o fenômeno não ocorreu nas outras condições devido à uma saturação da proteína durante às 24 h de pré-tratamento, ou possivelmente devido à capacidade fagocítica das células ocorrer logo após o contato da rP21 com o seu receptor. Por outro lado, nós observamos uma diminuição da proliferação de *T. gondii* nas duas linhagens celulares, sugerindo que a passagem prévia da rP21 pela célula é capaz de manter os mecanismos que induzem essa diminuição da proliferação intracelular do parasito.

Após observarmos a diminuição da proliferação de *T. gondii*, nós levantamos a seguinte pergunta: a rP21 estaria causando algum efeito citotóxico direto no parasito? Para responder essa pergunta, nós avaliamos a capacidade de reinfecção de *T. gondii* que esteve em contato prévio com a proteína dentro da célula. De forma surpreendente, nós observamos que os parasitos retirados de células BeWo que foram tratadas com 40 µg/mL da rP21 tiveram uma maior capacidade de invasão. No entanto, as outras condições não alteraram a capacidade de invasão do *T. gondii* quando comparadas com o controle, sugerindo que a rP21 não possui efeito citotóxico direto no parasito. Em adição, de forma muito interessante, ao entrarem nas células esses parasitos também tiveram sua proliferação diminuída. É importante destacar que nesse experimento de reinfecção, as células que foram reinfetadas por esses parasitos não foram tratadas com rP21, e mesmo assim o fenômeno se repetiu. Nesse sentido, nós hipotetizamos que no momento da reinfecção pode ter tido resquícios de rP21 no meio contendo os parasitos, contribuindo para o resultado observado. No entanto, outra hipótese que não pode ser descartada é uma possível capacidade da rP21 estar aderida à membrana plasmática de *T. gondii*, mas experimentos adicionais são necessários para confirmar ou não essa hipótese.

Em seguida, nós avaliamos se a retirada da rP21 após às 24 h de tratamento seria capaz de reverter o efeito da diminuição da proliferação em células BeWo e HTR-8/SVneo. Confirmando nossos resultados anteriores, nós observamos que o tratamento com a rP21 diminuiu a proliferação de *T. gondii* em 24 e 48 h de tratamento. Por outro lado, a retirada da rP21 após 24 h com posterior tratamento com meio à 10% de SFB por mais 24 h, tende a reverter a proliferação de *T. gondii*, sugerindo que a presença da rP21 é importante para manter os mecanismos que induzem a diminuição da proliferação de *T. gondii*.

Após avaliarmos que a rP21 foi capaz de diminuir a proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo, nós buscamos investigar possíveis mecanismos que estariam promovendo essa diminuição. Estudos anteriores demonstraram que a rP21 induz a polimerização do citoesqueleto de actina (RODRIGUES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017), e que essa polimerização pode formar uma barreira física que prejudica a proliferação intracelular de *T. cruzi* (MARTINS et al., 2020). Nesse sentido, nós investigamos a polimerização da actina em células BeWo e HTR-8/SVneo. Em células BeWo, nós observamos que a rP21 sozinha foi capaz de aumentar a polimerização da actina em relação às células não tratadas. Em adição, a infecção também aumentou a actina, e esse aumento observado pode ser devido à uma maior polimerização da actina ainda no momento da invasão do parasito, uma vez que estudos demonstram que a actina do hospedeiro é importante para a entrada de *T. gondii* (GONZAZEL et al., 2009; DELORME-WALKER et al., 2012). Apesar de não observarmos diferença estatística, nós observamos uma tendência de aumento da actina em células infectadas e tratadas com 40 µg/mL em relação às células apenas infectadas. Essa maior quantidade de actina promovida pela rP21 pode criar, assim como para *T. cruzi*, uma barreira física que limita a proliferação de *T. gondii*, mas que pode ajudar a proteger o parasito da resposta imune hospedeira. Nas células HTR-8/SVneo, diferente de estudos anteriores, nós observamos que o tratamento com 40 µg/mL da rP21 diminuiu a actina. Por outro lado, células infectadas e tratadas com a mesma concentração tiveram uma maior polimerização da actina quando comparadas com as células apenas infectadas, sugerindo um mecanismo parecido que foi visto nas células BeWo. Em adição, nós observamos que a concentração de 80 µg/mL em células BeWo infectadas diminuiu a quantidade de actina em relação às células apenas infectadas, enquanto que essa mesma concentração não alterou a quantidade de actina em células HTR-8/SVneo infectadas, sugerindo que o controle da proliferação visto nessa concentração pode não estar relacionado com a polimerização da actina nas duas linhagens celulares. No entanto, mais repetições desse experimento serão feitas para avaliar o real impacto da rP21 na polimerização de actina em células BeWo e HTR-8/SVneo.

Posteriormente, nós avaliamos a resposta imune induzida pela rP21 que poderia estar contribuindo para a diminuição da proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo. Primeiro, nós observamos que a infecção induziu uma maior produção de ROS nas duas linhagens celulares, sugerindo uma resposta celular para combater a infecção. No entanto, nós observamos que a rP21 tendeu a diminuir a produção de ROS nas duas linhagens celulares, sugerindo que o controle da proliferação de *T. gondii* pela rP21 pode não estar relacionado com esse mediador inflamatório. Estudos demonstram que a infecção por *T. gondii* induz a produção em excesso de ROS, podendo levar a morte celular por apoptose em trofoblasto humano e causando danos à placenta, o que pode contribuir para algumas patologias, como a pré-eclâmpsia e o aborto (XU et al., 2015; DONG et al., 2021). Nesse sentido, nós hipotetizamos que a rP21 pode estar modulando a resposta celular a favor do parasito, uma vez que ela diminuiu a produção de ROS nas duas linhagens celulares, criando um ambiente em que o parasito fica protegido e não causa estresse oxidativo para a célula. No entanto, experimentos futuros são necessários para avaliar o papel da rP21 na morte celular de células BeWo e HTR-8/SVneo.

Em seguida, nós avaliamos a produção de citocinas em células BeWo e HTR-8/SVneo. Em células BeWo, nós observamos que a rP21 tendeu a uma maior produção de MIF e diminuição de IL-8, enquanto que nas células HTR-8/SVneo nós observamos uma menor produção de MIF, uma maior produção de IL-6 e uma tendência a aumentar a produção de IL-10.

MIF é uma citocina pró-inflamatória expressa por uma variedade de células, sendo um mediador importante na imunidade inata e adaptativa, além de ser importante no controle de infecções causadas por protozoários (BOZZA et al., 2012; TERRAZAS et al., 2017). Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram o papel protetor de MIF na infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal (GOMES et al., 2011; BARBOSA et al., 2014; DA SILVA et al., 2017; FRANCO et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2021). Nossos dados em células BeWo mostram que células infectadas e tratadas com 40 µg/mL tenderam a uma maior produção de MIF em relação às células apenas infectadas, sugerindo que essa citocina pode estar envolvida na diminuição da proliferação de *T. gondii* visto em células BeWo. Apesar do seu papel protetivo na infecção por *T. gondii*, inclusive em células BeWo, recentemente um estudo do nosso grupo mostrou que a inibição de MIF diminuiu a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo (MILIAN et al., 2019). No entanto, a adição de MIF recombinante aumentou a expressão de ciclooxygenase-2 (COX-2) e favoreceu o crescimento do parasito, sugerindo que nessas células MIF possui um papel que favorece a proliferação de *T. gondii*.

(MILIAN et al., 2019). Nossos dados em células HTR-8/SVneo mostraram que a rP21 induziu uma diminuição da produção de MIF, sugerindo que o controle da proliferação de *T. gondii* promovido pela proteína pode ser explicado pela diminuição da produção de MIF nessas células.

IL-6 é uma citocina multifuncional produzida pelo trofoblasto humano, pois está associada ao desenvolvimento placentário normal e gravidez bem-sucedida (DUBINSKY et al., 2010; CHAMPION et al., 2012; PRINS; GOMEZ-LOPEZ; ROBERTSON, 2012; GOYAL et al., 2013). Estudos do nosso grupo mostram que a IL-6 também é importante no controle da proliferação por *T. gondii* (CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; SILVA et al., 2017; COSTA et al., 2021; SOUZA et al., 2021). Nossos dados em células BeWo mostram que a rP21 não alterou a produção dessa citocina em relação às células somente infectadas. Por outro lado, nas células HTR-8/SVneo, nós observamos uma tendência a aumentar a produção dessa citocina, sugerindo que o controle da proliferação de *T. gondii* também pode estar associado com a produção de IL-6 nessas células.

IL-8 é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, inclusive em células trofoblásticas humanas (FUJISAWA et al., 2000; MILIAN et al., 2019). Estudos do nosso grupo mostraram que essa citocina está relacionada com uma maior proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo (MILIAN et al., 2019). No entanto, a produção dessa citocina em nossos experimentos em células HTR-8/SVneo não teve diferença entre os grupos (dados não mostrados). Por outro lado, nossos dados em células BeWo mostram que tanto a rP21 quanto a infecção por *T. gondii* diminuiu a produção de IL-8, sugerindo que o controle da proliferação de *T. gondii* em células BeWo pode não estar relacionado com a produção dessa citocina.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória muito presente no microambiente placentário, contribuindo para a tolerância materno-fetal, o que pode facilitar a infecção por *T. gondii* (ENTRICAN, 2002; BARBOSA et al., 2008). Apesar de não observarmos diferença estatística, nossos dados em células HTR-8/SVneo mostram que a rP21 tendeu a aumentar a produção dessa citocina em células infectadas, sugerindo que o controle da proliferação de *T. gondii* pode não estar relacionado com essa citocina, mas seu aumento pode contribuir para manter a tolerância imune na interface materno fetal.

Após avaliarmos o papel da rP21 em modelos *in vitro*, nós avaliamos o efeito dessa proteína em vilos coriônicos humanos, um modelo *ex vivo*. Nós observamos que a rP21 não alterou a viabilidade de vilos coriônicos humanos. Em adição, diferente dos resultados vistos nas células, nós observamos que o tratamento prévio ou pós infecção com a rP21 aumentou a

proliferação de *T. gondii*, e mesmo quando ela foi retirada e os vilos foram tratados com meio à 10% de SFB, o efeito não foi revertido. A diferença de resultados visto nos dois modelos pode ser explicada, pelo menos em parte, devido ao fato de que os vilos coriônicos humanos serem um tecido composto de mesênquima, citotrofoblasto viloso e extraviloso, além do sincitiotrofoblasto, o que pode representar melhor os resultados do que os vistos apenas nas células isoladas. Estudos prévios mostraram o papel da rP21 também na infecção por outro protozoário, *Leishmania amazonensis* (TEIXEIRA et al., 2018). Os autores observaram que camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com rP21 via subcutânea nas patas traseiras tiveram um aumento de 10 vezes no parasitismo. Por outro lado, aqueles animais que foram infectados por *T. cruzi* tiveram diminuição no parasitismo. Baseado nos nossos resultados em vilos e nesse estudo prévio, sugere-se que o efeito da rP21 pode ser espécie-específico, além dessas diferenças poderem estar ligadas a características intrínsecas à infecção por esses diferentes parasitos. Nossos resultados em vilos coriônicos humanos sugerem que a rP21 tem um papel de auxiliar na infecção por *T. gondii*, no entanto, mais repetições desse experimento são necessárias para avaliar o papel da rP21 na infecção pelo parasito, além de avaliar outros mecanismos, como a resposta imune, que podem estar favorecendo esse aumento na proliferação.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos que a rP21 contribui para a entrada de *T. gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas e extravilosas, e quando o parasito entra na célula, a rP21 induz mecanismos intracelulares que favorece a permanência do parasito no hospedeiro, como a polimerização do citoesqueleto de actina, a diminuição de ROS e um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma diminuição da proliferação de *T. gondii*, mas que pode estar ajudando o parasito a passar despercebido pela resposta imune hospedeira e não causando danos à célula. Por outro lado, sugerindo que a rP21 pode ajudar na manutenção da infecção, nós demonstramos que a rP21 aumenta a proliferação de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse aumento precisam ser elucidados. Esse é o primeiro estudo que mostra o papel da rP21 na infecção por *T. gondii*, sugerindo que além de ser uma proteína chave para a patogênese da doença de Chagas, pode contribuir para a infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal.

8. FIGURAS

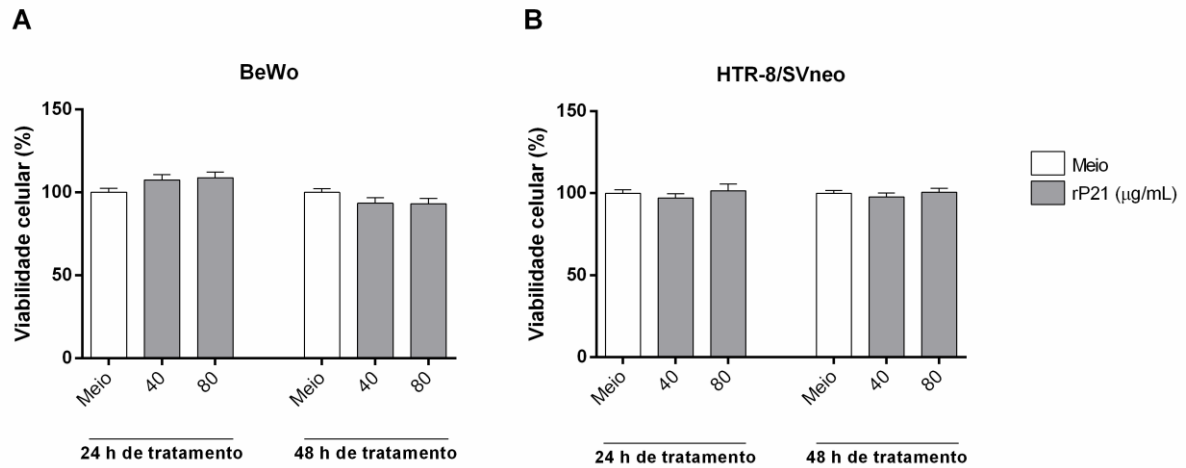


Figura 1: Viabilidade celular em células BeWo e HTR-8/SVneo tratadas com rP21. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Em seguida, as células foram tratadas com a rP21 (40 e 80 µg/mL) em meio a 10% de SFB em duas condições experimentais: (I) um grupo foi tratado durante 24 h; e o outro grupo (II) foi tratado durante 48 h, com reposição da rP21 após as primeiras 24 h de tratamento. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de MTT e os dados foram apresentados como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação as células não tratadas (meio, 100% de viabilidade). Foi realizado um experimento independente em sextuplicata.

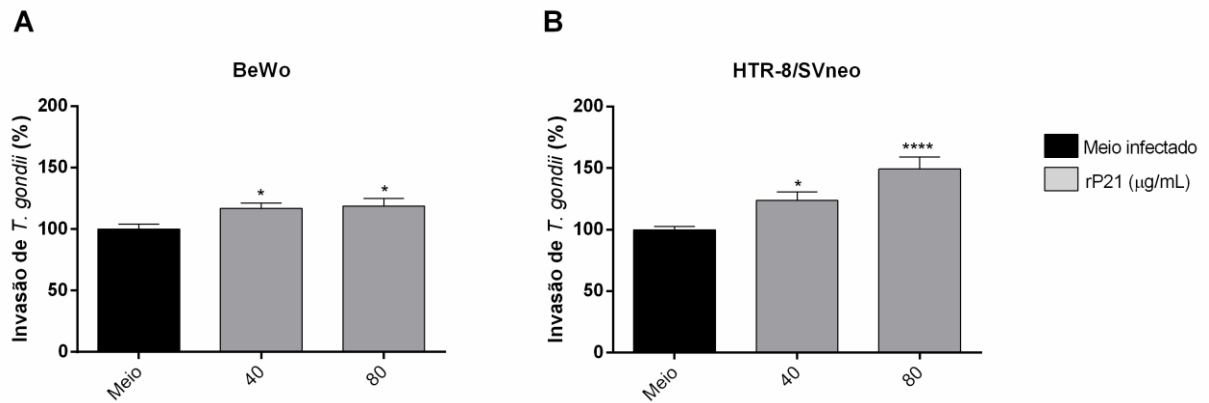


Figura 2: Ensaio de invasão de *T. gondii* juntamente com a rP21 em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* (3:1) concomitante ao tratamento com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por 3 h. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram submetidas ao ensaio de β-galactosidase. Os dados foram apresentados como % de invasão de *T. gondii* em relação as células apenas infectadas (meio infectado, 100% de invasão). Diferenças significativas em relação às células apenas infectadas (**P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foi realizado um experimento independente em oituplicata.

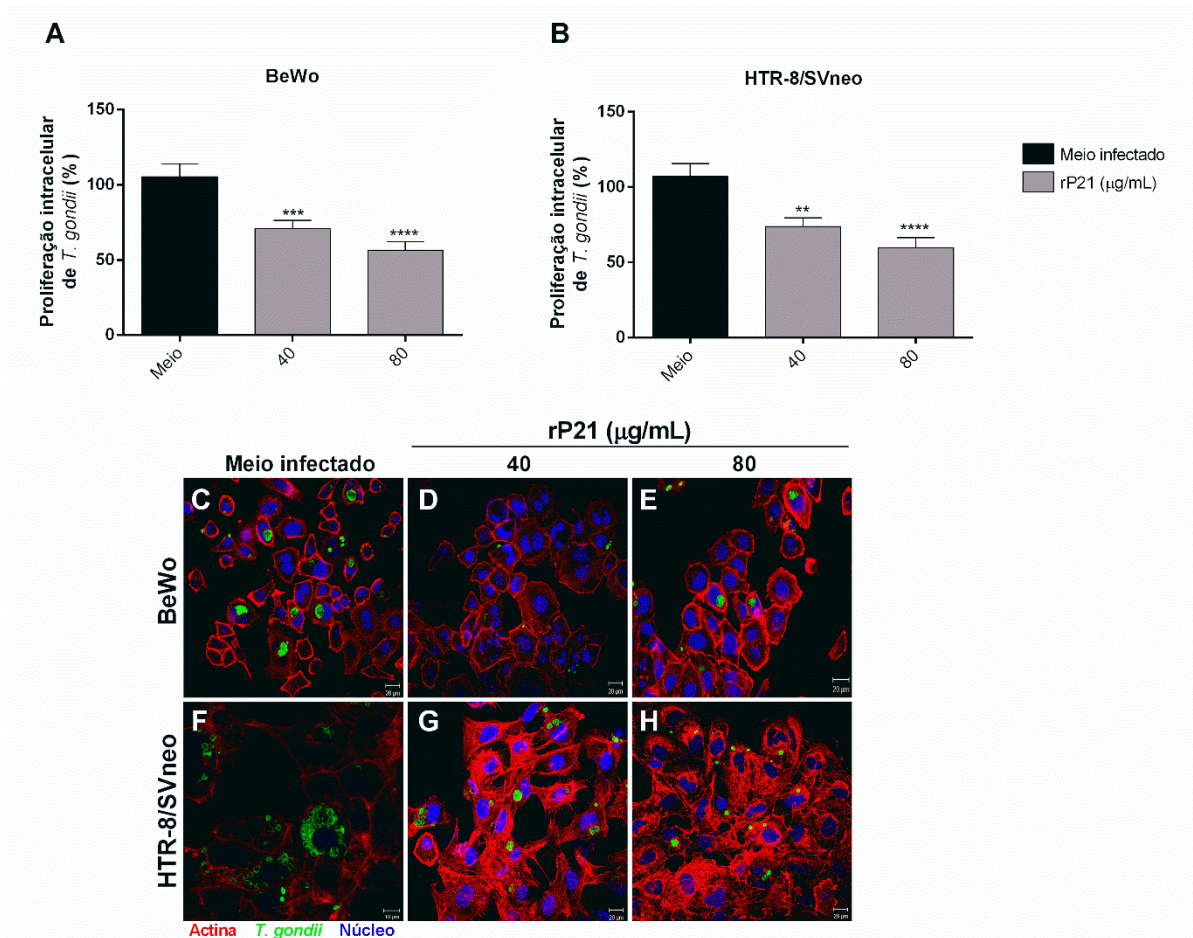


Figura 3: Ensaio de proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* (3:1) por 3 h. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por 24 h. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de β-galactosidase. Os dados foram apresentados como % de proliferação intracelular de *T. gondii* em relação as células apenas infectadas (meio infectado, 100% de proliferação). Diferenças significativas em relação às células apenas infectadas (*P). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados quatro experimentos independentes em sextuplicata. Imagens representativas (aumento de 40x) de células BeWo (Fig. 3C-E) e HTR-8/SVneo (Fig. 3F-H) são evidenciadas, onde é possível observar um grande número de taquizoítas de *T. gondii* em células infectadas e não tratadas (C e F) em relação as células infectadas e tratadas com rP21 40 µg/mL (D e G) e 80 µg/mL (E e H). Escala da barra: 20 µm.

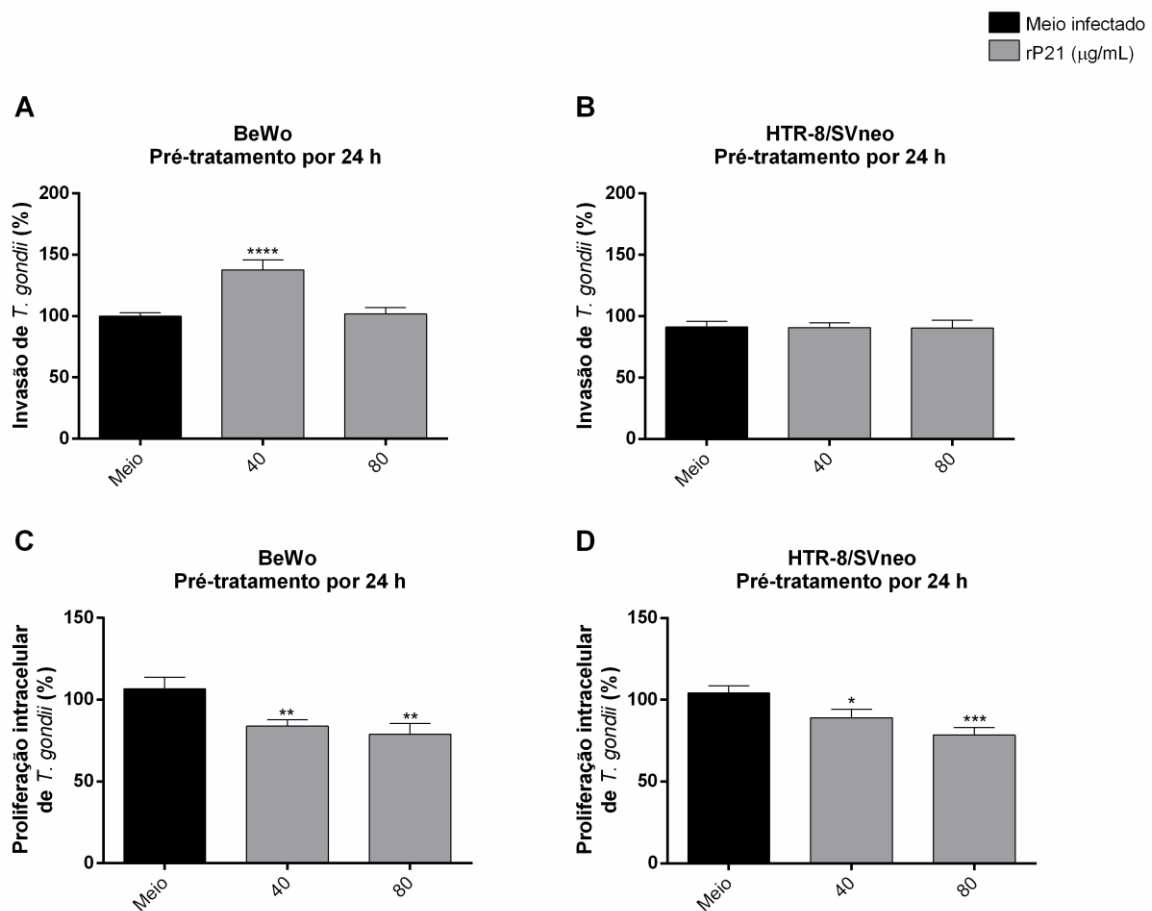


Figura 4: Ensaio de invasão e proliferação de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo pré-tratadas por 24 h com a rP21. Células BeWo (A,C) e HTR-8/SVneo (B,D) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram pré-tratadas com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por 24 h. Após o tempo, o tratamento foi removido e as células foram infectadas por *T. gondii* (3:1) por 3 h. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e uma placa foi submetida ao ensaio de invasão (A,B), e na outra placa foi adicionado meio com 10% de SFB por adicionais 24 h para análise da proliferação (C,D), ambos pelo ensaio de β -galactosidase. Os dados foram apresentados como % de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em relação as células apenas infectadas (meio infectado, 100% de proliferação). Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (**P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados três experimentos independentes em sextuplicata.

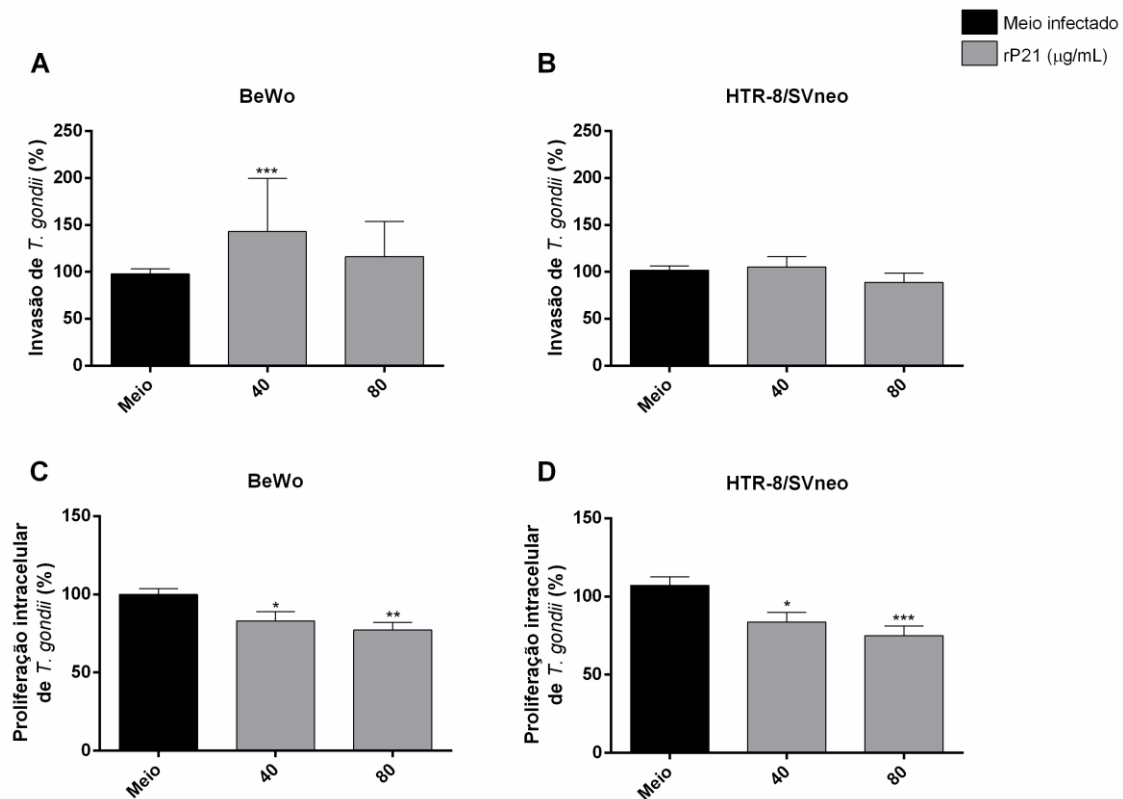


Figura 5: Ensaio de reinfecção de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo (A,C) e HTR-8/SVneo (B,D) foram cultivadas em placas de 6 poços na proporção de $1 \times 10^6/2000 \mu\text{l}$ por poço por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* (3:1) por 3 h. Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com a rP21 (40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com meio sem SFB para retirada de parasitos extracelulares, e os parasitos intracelulares foram isolados por 10 passagens mecânicas através de seringas acopladas com agulhas de calibre 21 e 26 gauges, respectivamente. O lisado foi centrifugado à 1500 rpm por 30 sec para remoção de debris celulares, e os parasitos isolados de cada condição experimental foram usados para reinfestar novas células BeWo e HTR-8/SVneo que foram previamente plaqueadas em placas de 96 poços ($3 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ e $2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$, respectivamente) na proporção 3:1 em meio com 2% de SFB. Após 3 h de infecção, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção de parasitos extracelulares, e uma placa foi submetida ao ensaio de invasão (A,B), e na outra placa foi adicionado meio com 10% de SFB por adicionais 24 h para análise da proliferação (C,D), ambos pelo ensaio de β -galactosidase. Os dados foram apresentados como % de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em relação às células apenas infectadas (meio infectado, 100% de proliferação). Diferenças significativas em relação as células infectadas e não tratadas (**P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados três experimentos independentes em oito replicatas.

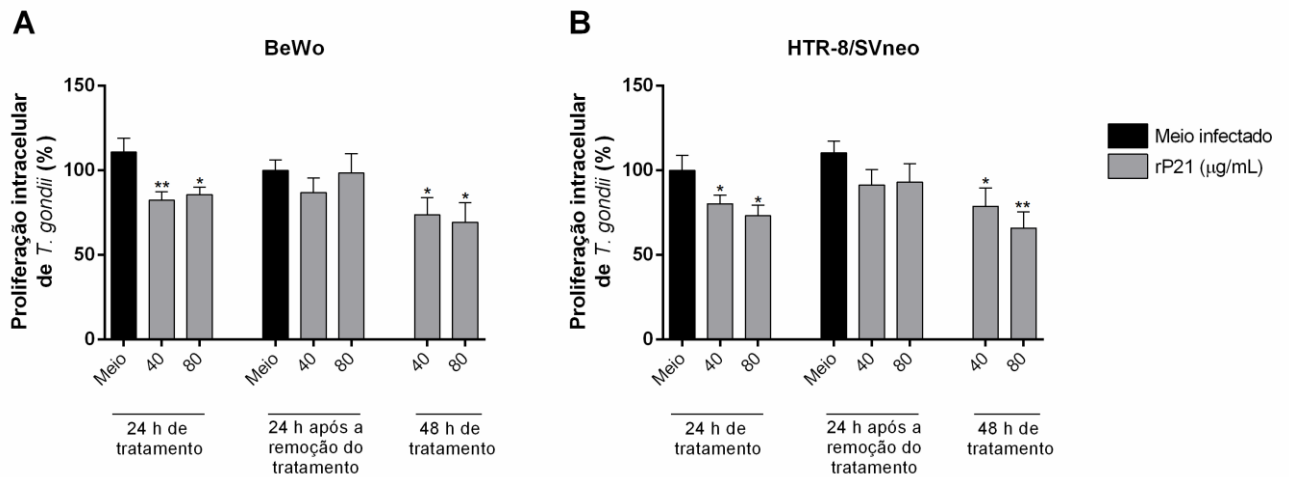


Figura 6: Ensaio de reversibilidade de *T. gondii* em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* (3:1) por 3 h. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por 24 h. Após o tempo, três condições experimentais distintas foram avaliadas: (I) após 24 h de tratamento, um grupo foi submetido ao ensaio de β-galactosidase (24 h de tratamento); (II) após 24 h, outro grupo teve o tratamento removido e adicionado meio com 10% de SFB por mais 24 h (24 h após a remoção do tratamento); e (III) após 24 h, outro grupo foi tratado novamente com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por mais 24 h (48 h de tratamento), e após o tempo dos dois últimos grupos (II e III), estes foram submetidos ao ensaio de β-galactosidase. Os dados foram apresentados como % de proliferação intracelular de *T. gondii* em relação as células apenas infectadas (meio infectado, 100% de proliferação). Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (**P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados três experimentos independentes em sextuplicata.

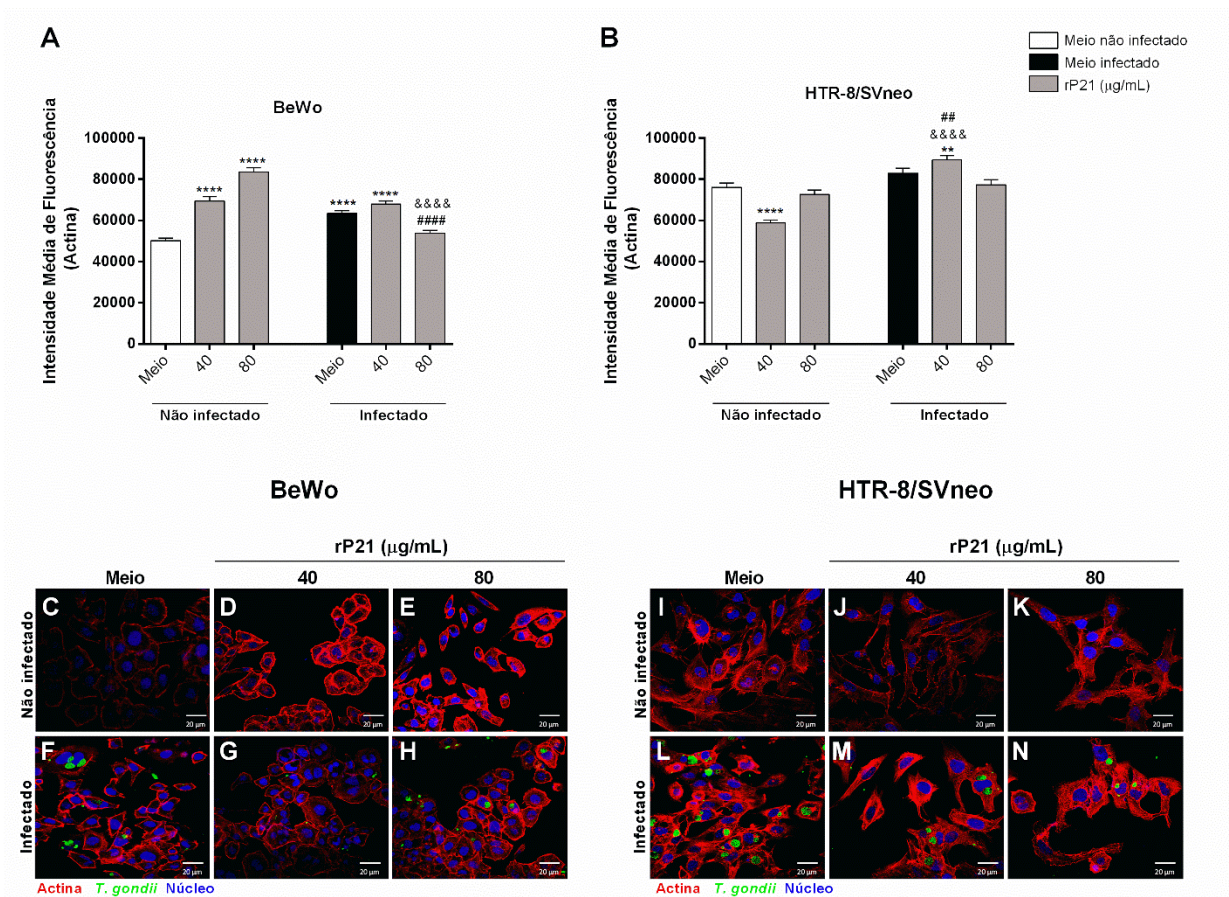


Figura 7: Análise da polimerização do citoesqueleto de actina em células BeWo e HTR-8/SVneo.

Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares (13 mm) na proporção de 1×10^5 e 6×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas ou não por *T. gondii* (3:1) por 3 h. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas ou não com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por 24 h. Após o tempo, as lamínulas foram processadas para marcação do citoesqueleto de actina, *T. gondii* e núcleo, e analisadas em um microscópio de fluorescência confocal. Um total de 100 células em triplicata de cada condição foram analisadas quanto a intensidade média de fluorescência da actina no software Image J versão 1.50i. Diferenças significativas em relação às células não infectadas e não tratadas (*P), infectadas e não tratadas (#P) e entre células infectadas ou não e tratadas com a mesma concentração (&P). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis com pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Foi realizado um experimento independente em triplicata. Imagens representativas (aumento de 40x) de células BeWo (C-H) e HTR-8/SVneo (Fig. 3I-N) são evidenciadas, onde é possível observar a marcação da actina (vermelho), *T. gondii* (verde) e núcleo (azul) em células não infectadas e não tratadas (C e I), tratadas com rP21 40 µg/mL (D e J), 80 µg/mL (E e K), células apenas infectadas (F e L), infectadas e tratadas com rP21 40 µg/mL (G e M) e 80 µg/mL (H e N). Escala da barra: 20 µm.

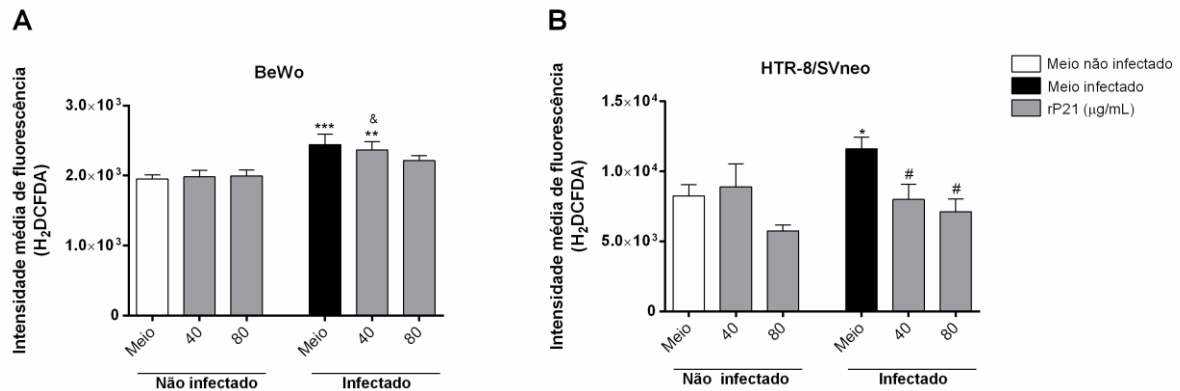


Figura 8: Análise da produção de ROS em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 24 poços na proporção de 1×10^5 e 8×10^4 células/500 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas ou não por *T. gondii* (3:1) por 3 h. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas ou não com a rP21 (40 e 80 µg/mL) por 24 h. Após o tempo, as células foram colhidas dos poços, centrifugadas à 1500 rpm por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 100 µl de H₂DCFDA (10 µM diluído em PBS 1x com 10% de SFB) por 45 min à 37 °C e 5% de CO₂ no escuro. Como controle positivo de indução de ROS, células BeWo e HTR-8/SVneo foram tratadas previamente à incubação com 5% de H₂O₂ (diluído em PBS 1x) por 30 min. A intensidade média de fluorescência de H₂DCFDA foi detectada e analisada por citometria de fluxo. Diferenças significativas em relação às células não infectadas e não tratadas (**P*), infectadas e não tratadas (#*P*) e entre células infectadas ou não e tratadas com a mesma concentração (&*P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados dois experimentos independentes em quintuplicata.

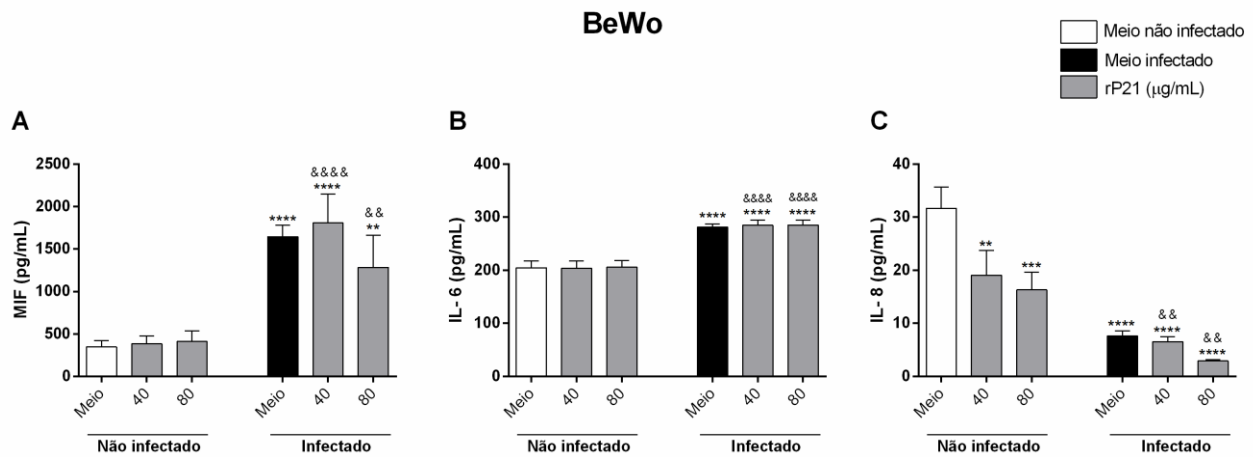


Figura 9: Análise do perfil de citocinas secretadas por células BeWo. Os sobrenadantes de células BeWo não infectadas e não tratadas, apenas tratadas, apenas infectadas e infectadas e tratadas foram submetidos à dosagem de citocinas pelo ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. (A) MIF, (B) IL-6 e (C) IL-8. Diferenças significativas em relação às células não infectadas e não tratadas ($*P$), infectadas e não tratadas ($#P$) e entre células infectadas ou não e tratadas com a mesma concentração ($&P$). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

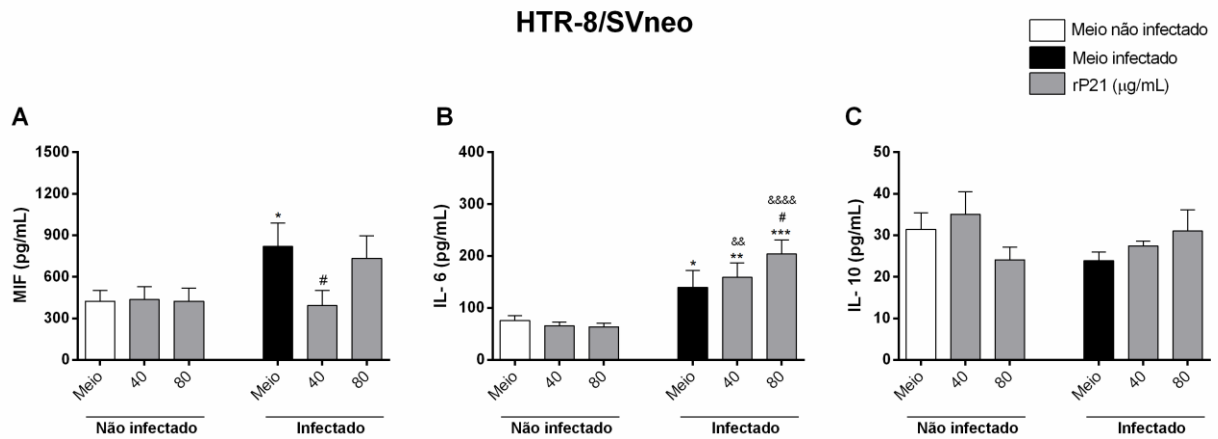


Figura 10: Análise do perfil de citocinas secretadas por células HTR-8/SVneo. Os sobrenadantes de células HTR-8/SVneo não infectadas e não tratadas, apenas tratadas, apenas infectadas e infectadas e tratadas foram submetidos à dosagem de citocinas pelo ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão para cada citocina analisada. **(A)** MIF, **(B)** IL-6 e **(C)** IL-10. Diferenças significativas em relação às células não infectadas e não tratadas (**P*), infectadas e não tratadas ([#]*P*) e entre células infectadas ou não e tratadas com a mesma concentração (&*P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

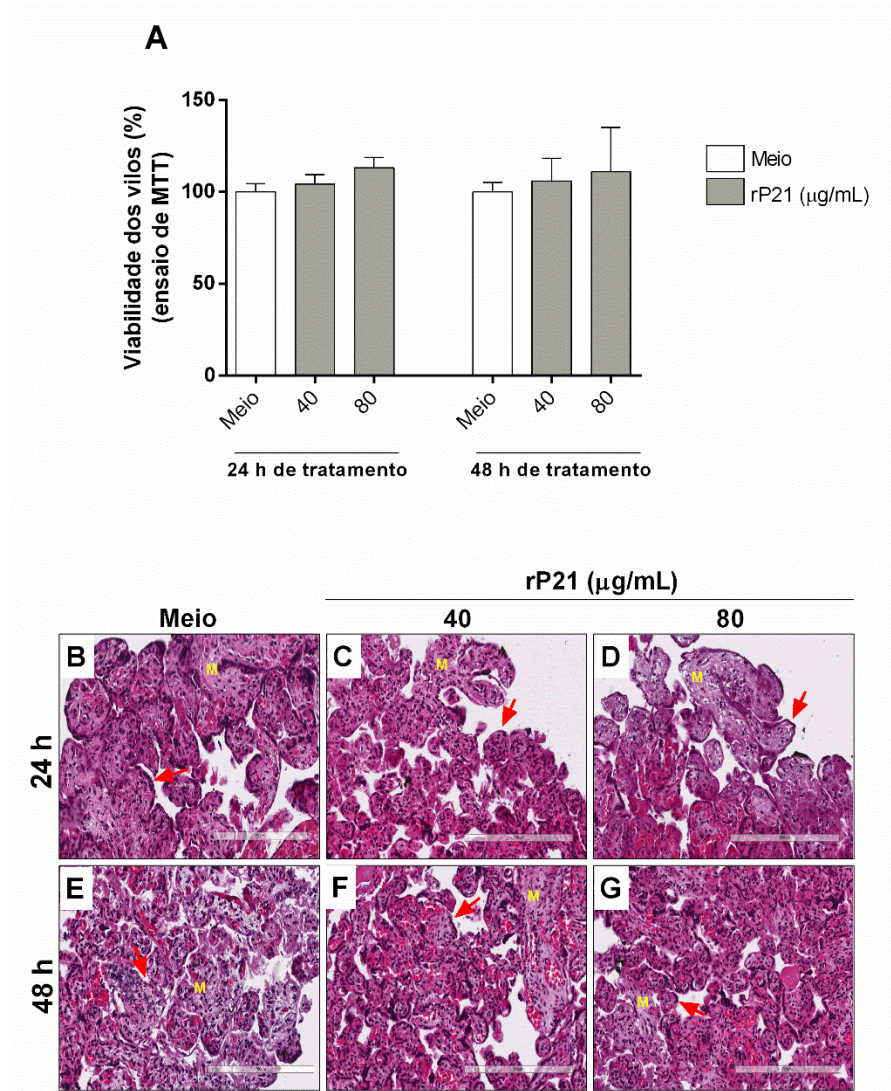


Figura 11: Viabilidade de vilos coriônicos humanos tratados com rP21. Os vilos coriônicos humanos foram coletados cultivados em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 24 h. Em seguida, os vilos foram tratados com rP21 (40 e 80 µg/mL) em meio com 10% de SFB em duas condições experimentais: (I) um grupo foi tratado durante 24 h; e o outro grupo (II) foi tratado durante 48 h, com reposição da rP21 após as primeiras 24 h de tratamento. Após o tempo, os vilos foram submetidos ao ensaio de MTT e os dados foram apresentados como % de vilos viáveis (% de viabilidade dos vilos) em relação aos vilos não tratados (100% de viabilidade) (A). Foi realizado um experimento independente em quintuplicata. Fotomicrografias representativas de vilos não tratados por 24 e 48h (B,E), ou tratados com 40 µg/mL de rP21 por 24 e 48 h (C,F) ou 80 µg/mL por 24 e 48 h (D,G), onde é possível observar a morfologia do sinciciotrofoblasto (seta) e mesênquima (M) preservados quando comparados aos vilos não tratadas (meio). Escala da barra: 200 µm.

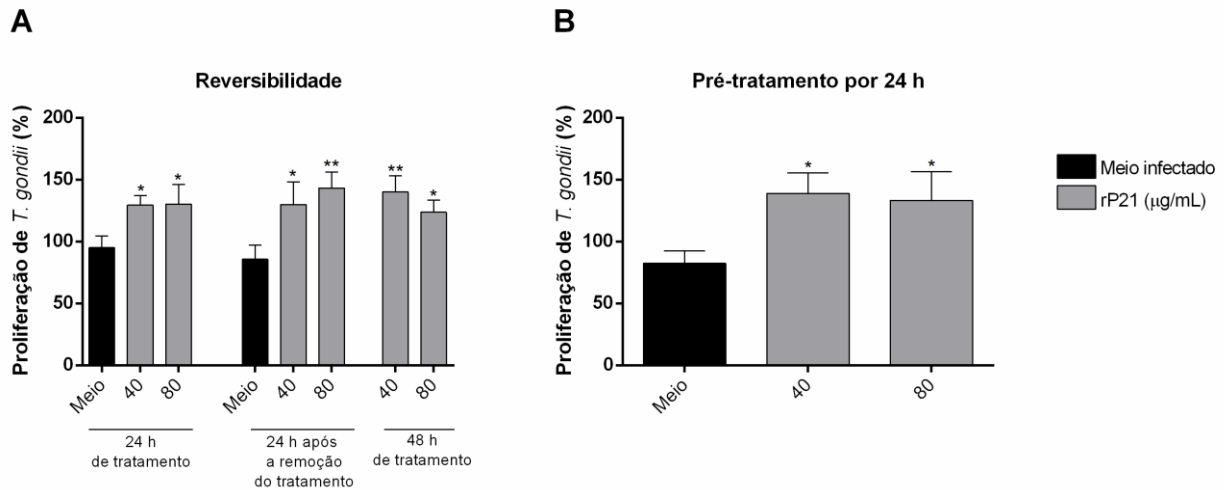


Figura 12: Proliferação de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos. Os vilos coriônico humanos foram cultivados em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 24 h. Em seguida, os vilos foram infectados por *T. gondii* (1×10^6) por mais 24 h. Após o tempo, três condições experimentais distintas foram avaliadas: (A) I- após 24 h de tratamento, um grupo de vilos foram coletados para análise da proliferação pelo ensaio de β -galactosidase (24 h de tratamento); II- após 24 h, outro grupo de vilos tiveram o tratamento removido e adicionado meio com 10% de SFB por mais 24 h (24 h após a remoção do tratamento); e III- após 24 h, outro grupo de vilos foram tratados novamente com a rP21 40 e 80 µg/mL por mais 24 h (48 h de tratamento), e após o tempo dos dois últimos grupos (II e III), os vilos foram coletados para análise pelo ensaio de β -galactosidase. Em outro experimento (B), os vilos foram pré-tratados com a rP21 (40 e 80 µg/mL) em meio com 10% de SFB por 24 h. Posteriormente, o tratamento foi retirado, e os vilos foram infectados com *T. gondii* (1×10^6) por mais 24 h. Após o tempo, os vilos foram coletados para análise da pelo ensaio de β -galactosidase. Os dados foram apresentados como % de proliferação de *T. gondii* em relação aos vilos apenas infectados (meio infectado, 100% de proliferação). Diferenças significativas em relação aos vilos infectados e não tratados (*P). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Foram realizados dois experimentos independentes em quintuplicata (A) e sextuplicata (B).

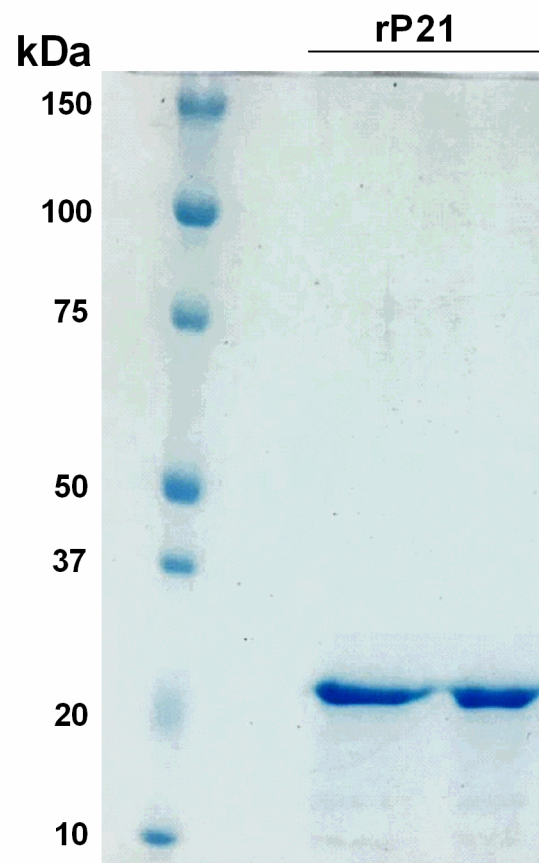


Figura suplementar 1: Purificação da rP21 em gel SDS-PAGE 13% com coloração por Coomassie Blue.

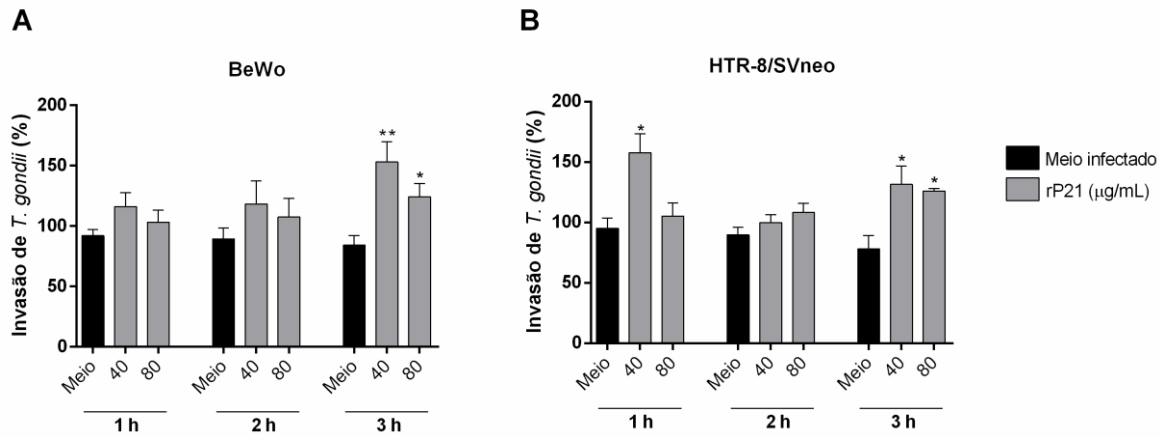


Figura suplementar 2: Ensaio de invasão de *T. gondii* juntamente com a rP21 em cinética de tempo em células BeWo e HTR-8/SVneo. Células BeWo (A) e HTR-8/SVneo (B) foram cultivadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 e 2×10^4 células/200 µl por poço, respectivamente, por 18 h. Posteriormente, elas foram infectadas por *T. gondii* (3:1) concomitante ao tratamento com a rP21 (40 e 80 µg/mL) em uma cinética de tempo para avaliar a invasão (1, 2 e 3 h). Após o tempo, os poços foram lavados três vezes com meio sem SFB para remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram submetidas ao ensaio de β-galactosidase. Os dados foram apresentados como % de invasão de *T. gondii* em relação as células apenas infectadas (meio infectado, 100% de invasão). Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (**P*). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis com pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Foi realizado um experimento independente em quintuplicata.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis.**, v. 188, n. 4, p. 608-616, 2003. doi: 10.1086/377132.
- AL-MALKI, E. S. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. **Saudi J Biol Sci.**, v. 28, n. 1, p. 962-969, 2021. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.007
- ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Sci Immunol.**, v. 4, n. 31, p. 1-11, 2019. doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114
- ANDRADE, W. A.; SOUZA, M. C.; RAMOS-MARTINEZ, E.; NAGPAL, K.; DUTRA, M. S.; MELO, M. B.; BARTHOLOMEU, D. C.; GHOSH, S.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host Microbe.**, v. 13, n. 1, p. 42-53, 2013. doi: 10.1016/j.chom.2012.12.003
- APLIN, J. D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. **J Cell Sci.**, v. 99, n. 4, p. 681-692, 1991.
- ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; DERMODY, T. S.; COYNE, C. B. Microbial vertical transmission during human pregnancy. **Cell Host Microbe.**, v. 21, n. 5, p. 561-567, 2017. doi: 10.1016/j.chom.2017.04.007
- ARRANZ-SOLÍS, D.; MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. J. P. Toxoplasma Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends Parasitol.**, v. 37, n. 4, p. 283-295, 2021. doi: 10.1016/j.pt.2020.10.013
- AZADI, Y.; AHMADPOUR, E.; AHMADI, A. Targeting strategies in therapeutic applications of toxoplasmosis: recent advances in liposomal vaccine delivery systems. **Curr Drug Targets**, v. 21, n. 6, p. 541-558, 2020. doi: 10.2174/1389450120666191023151423
- BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor beta1. **Clin Exp Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x.
- BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-162, 2014. doi: 10.1016/j.placenta.2013.12.013
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. **Early Development of the Human Placenta**. In: Pathology of the Human Placenta. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012. doi: 10.1007/978-3-642-23941-0_5

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

BLASZKOWSKA, J.; GÓRALSKA, K. Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. **Ann Parasitol.**, v. 60, n. 4, p. 225-234, 2014.

BOOTHROYD, J. C.; HAKIMI, M. A. **Chapter 17 - Effectors produced by rhoptries and dense granules: an intense conversation between parasite and host in many languages.** *Toxoplasma gondii* (Third Edition). Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), p. 789-806, 2020. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00017-7

BORGES, B. C.; UEHARA, I. A.; DOS SANTOS, M. A.; MARTINS, F. A.; SOUZA, F. C. JUNIOR, A. F.; LUZ, F. A. C.; COSTA, M. S.; NOTÁRIO, A. F. O.; LOPES, D. S.; TEIXEIRA, S. C.; TEIXEIRA, T. L.; CASTILHOS, P.; SILVA, C. V.; SILVA, M. J. B. The Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Interacts With CXCR4 Receptor and Abrogates the Invasive Phenotype of Human Breast Cancer Cells. **Front Cell Dev Biol.**, v. 8, n. 569729, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.569729.

BORGES, M.; SILVA, T. M.; BRITO, C.; TEIXEIRA, N.; ROBERTS, C. W. How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? **Parasite Immunol.**, v. 41, n. 3, e12606, 2019. doi: 10.1111/pim.12606.

BOZZA, M. T.; MARTINS, Y. C.; CARNEIRO, L. A.; PAIVA, C. N. Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. **J Parasitol Res.**, v. 2012, n. 413052, 2012. doi: 10.1155/2012/413052

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976. doi: 10.1006/abio.1976.9999

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **Am J Obstet Gynecol.**, v. 213, S6.e1, p. 6-8, 2015. doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.050

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: A review. **Acta Trop.**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.10.018

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 83-89, 2007. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.017

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

CASTRO-FILICE, L. S.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; GOMES, A. O.; ALVES, C. M. O. S.; SILVA, D. A. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection

in human villous explants. **J Trans Med.**, v. 132, n. 12, p. 1-12, 2014. doi: 10.1186/1479-5876-12-132

CHAMPION, H.; INNES, B. A.; ROBSON, S. C. LASH, G. E.; BULMER, J. N. Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. **Mol Hum Reprod.**, v. 18, n. 8, p. 391-400, 2012. doi: 10.1093/molehr/gas010

CHAUDHRY, S. A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Can Fam Physician.**, v. 60, n. 4, p. 334-336, 2014.

COPPENS, I. How *Toxoplasma* and malaria parasites defy first, then exploit host autophagic and endocytic pathways for growth. **Curr Opin Microbiol.**, v. 40, p. 32-39, 2017. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.009

COSTA, I. N.; RIBEIRO, M.; FRANCO, P. S.; SILVA, R. J.; ARAÚJO, T. E.; MILIÁN, I. C. B.; LUZ, L. C.; GUIRELLI, P. M.; NAKAZATO, G.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V. Biogenic Silver Nanoparticles Can Control *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Front Microbiol.**, v. 11, n. 623947, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2020.623947

COSTA, M. L.; NOBREGA, G. M.; ANTOLINI-TAVARES, A. Key infections in the placenta. **Obstet Gynecol Clin North Am.**, v. 47, n. 1, p. 133-146, 2020. doi: 10.1016/j.ogc.2019.10.003

DEKEL, N.; GNAINSKY, Y.; GRANOT, I.; MOR, G. Inflammation and implantation. **Am J Reprod Immunol.**, v. 63, n. 1, p. 17-21, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00792.x

DELORME-WALKER, V.; ABRIVARD, M.; LAGAL, V.; ANDERSON, K.; PERAZZI, A.; GONZALEZ, V.; PAGE, C.; CHAUVET, J.; OCHOA, W.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; TARDIEUX, I. Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. **J Cell Sci.**, v. 125, n. 18, p. 4333-4342, 2012. doi: 10.1242/jcs.103648

DENKERS, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2010, p. 1-7, 2010. doi: 10.1155/2010/737125

DING, G. C.; CHEN, M.; WANG, Y. X.; RUI, C.; XU, W.; DING, H. J.; SHI, Z. H. MicroRNA-128a-induced apoptosis in HTR-8/SVneo trophoblast cells contributes to pre-eclampsia. **Biomed Pharmacother.**, v. 81, p. 63-70, 2016. doi: 10.1016/j.biopha.2016.03.040

DOLCINI, G.; DERRIEN, M.; CHAOUAT, G.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; MENU, E. Cell-Free HIV Type 1 Infection is Restricted in the Human Trophoblast Choriocarcinoma BeWo Cell Line, Even with Expression of CD4, CXCR4 and CCR5. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 19, n. 10, 857-864, 2003. doi: 10.1089/088922203322493021

DONG, F.; XIAO, P.; LI, X.; CHANG, P.; ZHANG, W.; WANG, L. Cadmium triggers oxidative stress and mitochondrial injury mediated apoptosis in human extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells. **Reprod Toxicol.**, v. 101, p. 18-27, 2021. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.02.003

DOS SANTOS, M.A.; TEIXEIRA, F.B.; MOREIRA, H.H.; RODRIGUES, A.A.; MACHADO, F.C.; CLEMENTE, T.M.; BRIGIDO, P.C.; SILVA, R.T.; PURCINO, C.; GOMES, R.G.; BAHIA, D.; MORTARA, R.A.; MUNTE, C.E.; HORJALES, E.; DA SILVA, C.V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep.**, v. 4, p. 4259, 2014. doi: 10.1038/srep04259

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998. doi: 10.1016/s0020-7519(98)00023-x

DUBEY, J. P. **Chapter 1 - The history and life cycle of *Toxoplasma gondii***. *Toxoplasma gondii* (Third Edition). Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), 2020. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3

DUBEY, J. P.; HOETA, I.; OLARIU, T. T.; JONES, J. L.; DARABUS, G. Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. **Parasitology**, v. 141, n. 3, p. 311-325, 2014. doi: 10.1017/S0031182013001509

DUBINSKY, V.; POEHLMANN, T. G.; SUMAN, P.; GENTILE, T.; MARKERT, U. R.; GUTIERREZ, G. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. **Am J Reprod Immunol.**, n. 63, v. 3, p. 193-199, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00778.x

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012. doi: 10.1007/s00281-012-0339-3

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J Comp Pathol.**, n. 126, v. 2-3, p. 79-94, 2002. doi: 10.1053/jcpa.2001.0539

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

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

FERGUSON, D. J. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **Int J Parasitol.**, v. 34, n. 3, p. 347-360, 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.11.024

FISCH, D.; CLOUGH, B.; FRICKEL, E. M. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.**, v. 15, n. 12, e1008097, 2019. doi: 10.1371/journal.ppat.1008097

FRANCO, P. S.; GOIS, P. S. G.; ARAÚJO, T. E.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; IETTA, F.; SANTOS, L. A.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Brazilian

strains of *Toxoplasma gondii* are controlled by azithromycin and modulate cytokine production in human placental explants. **J Biomed Sci.**, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2019. doi: 10.1186/s12929-019-0503-3

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. doi: 10.1053/plac.1999.0494

GARCIA-MERIC, P.; FRANCK, J.; DUMON, H.; PIARROUX, R. [Management of congenital toxoplasmosis in France: current data]. **Presse Med.**, v. 39, n. 5, p. 530-538, 2010. doi: 10.1016/j.lpm.2009.09.016

GARWEG, J. G.; SCHERRER, J.; WALLON, M.; KODJIKIAN, L.; PEYRON, F. Reactivation of ocular toxoplasmosis during pregnancy. **BJOG**, v. 112, n. 2, p. 241-242, 2005. doi: 10.1111/j.1471-0528.2004.00302.x

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon by na intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 13, p. 6115-6119, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.13.6115

GAZZINELLI, R. T.; MENDONÇA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.004

GE, Y.; CHEN, J.; QIU, X.; ZHANG, J.; CUI, K.; QI, Y.; LIU, X.; QIU, J.; SHI, Z.; LUN, Z.; SHEN, J.; WANG, Y. Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN-gamma production by mice during infection with *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 44, n. 7, p. 475-484, 2014. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.03.004

GIGLEY, J. P. The diverse role of NK cells in immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 2, e1005396, 2016. doi: 10.1371/journal.ppat.1005396

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol.**, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, 2011. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.005

GONZALEZ, V.; COMBE, A.; DAVID, V.; MALMQUIST, N. A.; DELORME, V.; LEROY, C.; BLAZQUEZ, S.; MÉNARD, R.; TARDIEUX, I. Host Cell Entry by Apicomplexa Parasites Requires Actin Polymerization in the Host Cell. **Cell Host Microbe**, n. 5, v. 3, p. 259-272, 2009. doi: 10.1016/j.chom.2009.01.011

GOYAL, P.; BRUNNERT, D.; EHRHARDT, J.; BREDOW, M. PICCENINI, S.; ZYGMUNT, M. Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-phosphate receptor 2 involving Rho/Rho-kinase and Rac1 signaling pathways. **Mol Hum Reprod.**, v. 19, n. 8, p. 528-238, 2013. doi: 10.1093/molehr/gat023

GRAHAM, C. H.; HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G.; MACDOUGALL, J. R.; KERBEL, R. S.; KHOO, N.; LALA, P. K. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. **Exp Cell Res.**, v. 206, n. 2, p. 204-211, 1993. doi: 10.1006/excr.1993.1139

GUIRELLI, P. M., ANGELONI, M. B., BARBOSA, B. F., GOMES, A. O., CASTRO, A. S., FRANCO, P. S., SILVA, R. J., OLIVEIRA, J. G., MARTINS-FILHO, O. A., MINEO, J. R., IETTA, F., FERRO, E. A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 36, n. 10, p. 1106-1114, 2015. doi: 10.1016/j.placenta.2015.08.009

HALONEN, S. K.; WEISS L. M. Toxoplasmosis. **Handb Clin Neurol.**, v. 114, p. 125-145, 2013. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X

HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunol.**, v. 37, n. 3, p. 141-149, 2015. doi: 10.1111/pim.12163

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005. doi: 10.1079/ahr2005100

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect.**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x

HOO, R.; NAKIMULI, A.; VENTO-TORMOL, R. Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. **Front Immunol.**, v. 11, n. 2070, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.02070

HUPPERTZ, B.; GAUSTER, M. Trophoblast fusion. **Adv Exp Med Biol.**, v. 713, p. 81-95, 2011. doi: 10.1007/978-94-007-0763-4_6

ISHII, M.; HAYAKAWA, S.; SUZUKI, M. K.; HONDA, M.; NISHINARITA, S.; CHISHIMA, F.; NAGAISHI, M.; SATOH, K. Expression of functional chemokine receptors of human placental cells. **Am J Reprod Immunol.**, v. 44, n. 6, p. 365-373, 2000. doi: 10.1111/j.8755-8920.2000.440608.x

JONES, J.; LOPES, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **Am Fam Physician**, v. 67, n. 10, p. 2131-2138, 2003.

KAMERKAR, S.; DAVIS, P. H. *Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. **J Parasitol Res.**, v. 2012, n. 589295, 2012. doi: 10.1155/2012/589295

KOBLANSKY, A. A.; JANKOVIC, D.; OH, H.; HIENY, S.; SUNGNAK, W.; MATHUR, R.; HAYDEN, M. S.; AKIRA, S.; SHER, A.; GHOSH, S. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 119-130, 2013. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.016

- LI, X. L.; WEI, H. X.; ZHANG, H.; PENG, H. J.; LINDSAY, D. S. A meta analysis on risks of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS One**, v. 9, n. 5, e97775, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0097775
- MAHMOUDZADEH, S.; CHAROUDEH, H. N.; MARQUES, C. S.; BAHADORY, S.; AHMADPOUR, E. The role of IL-12 in stimulating NK cells against *Toxoplasma gondii* infection: a mini-review. **Parasitol Res.**, v. 120, n. 7, p. 2303-2309, 2021. doi: 10.1007/s00436-021-07204-w
- MAI, K.; SHARMAN, P. A.; WALKER, R. A.; KATRIB, M.; SOUZA, D.; MCCONVILLE, M. J.; WALLACH, M. G.; BELLI, S. I.; FERGUSON, D. J.; SMITH, N. C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 281-289, 2009. doi: 10.1590/s0074-02762009000200022
- MALASSINE, A.; FRENDON, J. L.; EVAIN-BRITON, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Hum Reprod Update**, v. 9, n. 6, p. 531-539, 2003. doi: 10.1093/humupd/dmg043
- MARTINS, F. A.; SANTOS, M. A.; SANTOS, J. G.; SILVA, A. A.; BORGES, B. C.; COSTA, M. S.; TAVARES, P. C. B.; TEIXEIRA, S. C.; BRÍGIDO, R. T. S.; TEIXEIRA, T. L.; RODRIGUES, C. C.; SILVA, N. S. L.; OLIVEIRA, R. C.; FARIA, L. C.; LEMES, M. R.; ZANON, R. G.; TOMIOSSO, T. C.; MACHADO, J. R.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, C. J. F.; SILVA, C. V. The Recombinant Form of Trypanosoma cruzi P21 Controls Infection by Modulating Host Immune Response. **Front Immunol.**, v. 11, n. 1010, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.01010
- MAYHEW, T. M. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 229-240, 2014. doi: 10.1016/j.placenta.2014.01.011
- MCLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 320-344, 2009. doi: 10.1590/s0074-02762009000200029
- MELCHOR, S. J.; EWALD, S. E. Disease Tolerance in *Toxoplasma* Infection. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 9, n. 185, 2019. doi: 10.3389/fcimb.2019.00185
- MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEJI, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011. doi: 10.1016/j.pt.2011.08.001
- MENDEZ, O. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 7, e1006351, 2017. doi: 10.1371/journal.ppat.1006351.
- MILIAN, I. C. B.; SILVA, R. J.; MANZAN-MARTINS, C.; BARBOSA, B. F.; GUIRELLI, P. M.; RIBEIRO, M.; GOMES, A. O.; IETTA, F.; MINEO, J. R.; FRANCO, P. S.; FERRO, E. A. V. Increased *Toxoplasma gondii* Intracellular Proliferation in Human Extravillous Trophoblast Cells (HTR8/SVneo Line) Is Sequentially Triggered by MIF, ERK1/2, and COX-2. **Front Microbiol.**, v. 10, n. 852, p. 1-13, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00852

- MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 39, n. 1, p. 23-29, 2009. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.002
- MONCADA, P. A.; MONTOYA, J. G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 10, n. 7, p. 815-828, 2012. doi: 10.1586/eri.12.58
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis.**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008. doi: 10.1086/590149
- MOR, G. Pregnancy reconceived. **Natural History**, v. 116, p. 36-41, 2007.
- MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. **Am J Reprod Immunol.**, v. 63, n. 6, p. 425-433, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- MURALIKRISHNA, P.; SUNIL, B.; SAVITA, R. K.; ARCHANA, S. N.; SUDHARSAN, M.; BHARATHI, S. V.; DRISHYA, P. Toxoplasmosis - The public health significance. **Int J Sci.**, v. 6, n. 5, p. 2752-2758, 2017.
- OLIVEIRA, V. J. **Efeitos da natação sobre os parâmetros morfofuncionais e imunológicos em um modelo murino de inflamação pulmonar induzido pelo alérgeno recombinante Blo t 5 do ácaro Blomia tropicalis**. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.130>
- OPSTEEGH, M.; KORTBEEK, T. M.; HAVELAAR, A. H.; VAN DER GIESSEN, J. W. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clin Infect Dis.**, v. 60, n. 1, p. 101-07, 2015. doi: 10.1093/cid/ciu721
- OZGONUL, C.; BESIRLI, C. G. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. **Ophthalmic Res.**, v. 57, n. 1, p. 1-12, 2017. doi: 10.1159/000449169
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol.**, v. 29, n. 12, p. 1385-1394, 2009. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003.
- PATTILLO, R. A.; GEY, G. O. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. **Cancer Res.**, v. 28, n. 7, p. 1231-1236, 1968.

PRINS, J. R.; GOMEZ-LOPEZ, N.; ROBERTSON, S. A. Interleukin 6 in pregnancy and gestational disorders. **J Reprod Immunol.**, v. 95, n. 1-2, p. 1-14, 2012. doi: 10.1016/j.jri.2012.05.004

RACICOT, K.; KWON, J. Y.; ALDO, P.; SILASI, M.; MOR, G. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. **Am J Reprod Immunol.**, v. 72, n. 2, p. 107-116, 2014. doi: 10.1111/aji.12289

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SILVA, N. M.; MINEO, J. R.; RODRIGUES JUNIOR, V. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. **Placenta**, v. 33, n. 9, p. 682-687, 2012. doi: 10.1016/j.placenta.2012.05.013

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

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **J Infect.**, v. 68, n. 1, p. S125-133, 2014. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.023

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T.M.; DOS SANTOS, M.A.; MACHADO, F.C.; GOMES, R.G.B.; MOREIRA, H.H.T.; CRUZ, M.C.; BRÍGIDO, P.C.; DOS SANTOS, P.C.F.; MARTINS, F.A.; BAHIA, D; MARICATO, J.T.; JANINI, L.M.; REBOREDO, E.H.; MORTARA, R.A.; DA SILVA, C.V. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **PLoS ONE**, v. 7, e51384, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051384

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod Toxicol.**, v. 21, n. 4, p. 458-472, 2006. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.10.006

SAITO, S., MIYAZAKI, S., SASAKI, Y. **Th1/Th2 Balance of the Implantation Site in Humans**. In: Mor G. (eds) Immunology of Pregnancy. Medical Intelligence Unit. Springer, New York, NY, 2006. doi: 10.1007/0-387-34944-8_4

SCHLUTER, D.; BARRAGAN, A. Advances and challenges in understanding cerebral toxoplasmosis. **Front Immunol.**, v. 10, n. 242, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00242

SILVA, C.V.; KAWASHITA, S.Y.; PROBST, C.M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M.C.; DA SILVA, E.A.; SOUTO-PADRÓN, T.C.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M.R.; ANDREWS, N.W.; MORTARA, R.A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 5, p. 563–570, 2009. doi: 10.1016/j.micinf.2009.03.007

SILVA, R. J.; GOMES, A. O.; FRANCO, P. S.; PEREIRA, A. S.; MILIAN, I. C. B.; RIBEIRO, M.; FIORENZANI, P.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; DA SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V.; DE FREITAS, B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from

Human Third Trimester Pregnancy. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 7, n. 340, p. 1-21, 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00340

SOUZA, G.; SILVA, R. J.; MILIÁN, I. C. B.; ROSINI, A. M.; ARAÚJO, T. E.; TEIXEIRA, S. C.; OLIVEIRA, M. C.; FRANCO, P. S.; SILVA, C. V.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V. BARBOSA, B. F. Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. *Sci Rep.*, v. 11, n. 1, 12709, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-92120-3.

TEIXEIRA, T. L. **Papel da proteína P21 de Trypanosoma cruzi na inflamação e na infecção crônica experimental in vivo.** 2018. 92 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.462>

TEIXEIRA, S. C.; LOPES, D. S.; GIMENES, S. N.; TEIXEIRA, T. L.; DA SILVA, M. S.; BRÍGIDO, R. T.; DA LUZ, F. A.; SILVA, A. A.; SILVA, M. A.; FLORENTINO, P. V.; TAVARES, P. C.; SANTOS, M. A.; ÁVILA, V. M.; SILVA, M. J.; ELIAS, M. C.; MORTARA, R. A.; SILVA, C. V. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Sci Rep.**, v. 21, n. 7, p. 1-14, 2017. doi: 10.1038/srep44978

TEIXEIRA, S. C.; SOUZA, G.; BORGES, B. C.; ARAÚJO, T. E.; ROSINI, A. M.; AGUILA, F. A.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. J. B.; MARTINS, C. H. G.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V. Copaifera spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, 15158, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-72230-0

TEIXEIRA, T. L.; CASTILHOS, P.; RODRIGUES, C. C.; SILVA, A. A.; BRÍGIDO, R. T.; TEIXEIRA, S. C.; BORGES, B. C.; DOS SANTOS, M. A.; MARTINS, F. A.; SANTOS, P. C. F.; SERVATO, J. P. S.; SILVA, M. S.; SILVA, M. J. B.; ELIAS, M. C.; SILVA, C. V. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. **Microb Pathog.**, v. 135, n. 103618, 2019. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103618

TEIXEIRA, T. L.; MACHADO, F. C.; SILVA, A. A.; TEIXEIRA, S. C.; BORGES, B. C.; SANTOS, M. A.; MARTINS, F. A.; BRÍGIDO, P. C.; RODRIGUES, A. A.; NOTÁRIO, A. F. O.; FERREIRA, B. A.; SERVATO, J. P. S.; DECONTE, S. R.; LOPES, D. S.; ÁVILA, V. M. R.; ARAÚJO, F. A.; TOMIOSSO, T. C.; SILVA, M. J. B.; SILVA, C. V. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Sci Rep.**, v. 5, n. 16877, 2015. doi: 10.1038/srep16877

TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.**, n. 30, v. 12-13, p. 1217-1258, 2000. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00124-7

TERRAZAS, C.; STOCK, J. C.; KIMBLE, J.; MORETTI, E.; VARIKUTI, S.; SATOSKAR, A. R. **The role of MIF in parasitic infections.** In: Bucala R, Bernhagen J, editors. MIF Family Cytokines in Innate Immunity and Homeostasis. Cham: Springer International Publishing. p. 203-219, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-52354-5_13

- TONG, W. H.; PAVEY, C.; O'HANDLEY, R.; VYAS, A. Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. **Parasit Vectors**, v. 14, n. 1, 2021. doi: 10.1186/s13071-020-04528-x
- TURCO, M. Y.; MOFFETT, A. Development of the human placenta. **Development**, v. 146, n. 22, dev163428, 2019. doi: 10.1242/dev.163428
- WALLON, M.; COZON, G.; ECOCHARD, R.; LEWIN, P.; PEYRON, F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. **Eur J Pediatr**, v. 160, n. 9, p. 534-540, 2001. doi: 10.1007/s004310100805
- WEISS, L.M., DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 895-901, 2009. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.004
- WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; STRIEPEN, B.; ROOS, D. S.; HUNTER, C.A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol**, v.23, p. 291-296, 2001. doi: 10.1046/j.1365-3024.2001.00389.x
- WU, D.; CHEN, X.; WANG, L.; CHEN, F.; CEN, H.; SHI, L. Hypoxia-induced microRNA-141 regulates trophoblast apoptosis, invasion, and vascularization by blocking CXCL12/CXCR2/4 signal transduction. **Biomed Pharmacother**, v. 116, n. 108836, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108836
- XIAO, C.; RUI, Y.; ZHOU, S.; HUANG, Y.; WEI, Y.; WANG, Z. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) promotes trophoblast cell invasion via miR-146a-EGFR/CXCR4 axis: A novel mechanism for preeclampsia? **Placenta**, v. 93, p. 8-16, 2020. doi: 10.1016/j.placenta.2020.02.011
- XU, X.; HE, L.; ZHANG, A.; LI, Q.; HU, W.; CHEN, H.; DU, J.; SHEN, J. *Toxoplasma gondii* isolate with genotype Chinese 1 triggers trophoblast apoptosis through oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mice. **Exp Parasitol**, v. 154, p. 51-61, 2015. doi: 10.1016/j.exppara.2015.04.008
- YAN, C.; LIANG, L. J.; ZHENG, K. Y.; ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 137, p. 1-7, 2016. doi: 10.1186/s13071-016-1432-6
- YANG, M.; CHEN, Y.; WANG, K.; PAN, T.; LIU, X.; XU, W. miR-15b-AGO2 play a critical role in HTR8/SVneo invasion and in a model of angiogenesis defects related to inflammation. **Placenta**, v. 41, p. 62-73, 2016. doi: 10.1016/j.placenta.2016.03.007
- YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1626-1629, 2005. doi: 10.1126/science.1109893

ANEXOS

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –

Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;

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

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

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

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

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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

Anexo 2

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Modulação do curso da infecção por *Toxoplasma gondii* pela proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rP21) em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR-8/SVneo) e em vilos placentários humanos.

Pesquisador: Bellisa de Freitas Barbosa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22916219.0.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.679.426