

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**A influência da infecção por *Toxoplasma gondii* na comunicação entre células trofoblásticas extravilosas humanas e macrófagos**

**Pâmela Mendonça Guirelli**

**Uberlândia  
Agosto – 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**A influência da infecção por *Toxoplasma gondii* na comunicação entre células trofoblásticas extravilosas humanas e macrófagos**

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

**Aluna: Pâmela Mendonça Guirelli**

**Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa**

**Uberlândia**

**Agosto – 2014**

## *Dedicatória*

*Todas as criaturas humanas estão na Terra trilhando caminhos diversos por um objetivo principal: a evolução espiritual. E Deus em sua misericórdia infinita, ciente das fraquezas humanas, permite que encontremos nessa caminhada as pessoas certas que andarão conosco nos ajudando a sempre seguir em frente e não perder o foco. Algumas nos acompanham durante toda essa jornada auxiliando, vibrando, vivendo junto cada momento. Outros nos acompanham por determinado trecho e logo trilham outros caminhos, mas durante esse período nos deixam momentos felizes, que nos marcaram de certa forma, e por isso levaremos em memória até o fim.*

*No decorrer de minha pequena trajetória conquistas importantes pro meu crescimento pessoal e profissional foram vivenciadas, mas nada teria sido conquistado sem meus companheiros de jornada a quem dedico esse trabalho: minha família. Senhor, obrigada por consentir que pessoas tão maravilhosas partilhassem comigo cada momento. A sensação de dever cumprido não seria tão prazerosa se não tivesse com quem dividir e comemorar. Aos meus pais Felismar e Marizete, aos meus irmãos Públio e Paola e ao meu noivo Lucas que sempre estiveram comigo, me incentivando nos momentos de desânimo, tolerando os momentos de estresse e partilhando das alegrias. Vocês são meu porto seguro, minha inspiração, meu exemplo, pessoas que admiro e fazem minha vida ter sentido. Vocês que me ensinaram a crescer e fazem de mim uma pessoa cada dia mais completa e realizada. Obrigada por serem exatamente como são, meus melhores amigos. Que Deus permita que trilhem nossa jornada sempre juntos, nos apoiando mutuamente. Muito obrigada por estarem sempre comigo... Amo muito vocês... São essenciais para mim...*

## *Agradecimento*

*Durante essa caminhada, muitas pessoas passam por nosso caminho, e sempre deixam uma mensagem que auxiliam em algum momento. Cada encontro acrescenta um pedaço do outro e esse outro sempre leva um pedaço de nós. Pessoas importantes a quem hoje agradeço fizeram parte desse trajeto...*

*Obrigada Eloisa, por me escolher e fazer de mim membro de sua equipe. Obrigada pela confiança, pelo apoio e pelo reconhecimento de meu esforço. Nossa convivência me possibilitou um imenso crescimento pessoal e profissional, e serei sempre imensamente agradecida por isso.*

*Obrigada Bê, por ser a melhor co-orientadora que um aluno possa ter. Obrigada pelo imenso carinho com que me acolheu, pelo exemplo profissional e pessoal, pela paciência dedicada na interpretação dos resultados e leitura minuciosa do trabalho. Você é um exemplo pra mim, pessoa que admiro e que foi essencial para a realização dessa etapa. Obrigada Mari, pelo acompanhamento durante os experimentos, por me ajudar com a execução do trabalho e por ser exatamente a pessoa especial que é. Nossa convivência definitivamente acrescentou muito pra mim, obrigada de coração.*

*Obrigada Angel, pela atenção e pelo carinho que sempre me tratou. Suas contribuições sempre muito pertinentes também foram essenciais para mais essa conquista nossa...*

*Admiro muito esse seu lado pesquisadora que possui... você merece tudo de melhor...*

*Obrigada Andressinha, pelas caronas e pelas horas de conversas jogadas fora. Uma pequena pessoa, mas com um coração gigantesco que conquista todo mundo. Impossível não gostar dessa pequenininha...*

*Obrigada Celene, Dayane, Fernanda, Idessânia, Janice, Karine, Leticia, Mayara, Priscila, Rafaela e Renata por todos os momentos de descontração, desabaços, por todo apoio, carinho, ajuda, companhia, conselhos e sugestões. Vocês foram essenciais para essa conquista e definitivamente tornaram essa trajetória menos pesada.*

*Meninas... Vocês tornaram minha caminhada muito mais feliz e fizeram com que alguns momentos difíceis pudessem ser vistos com otimismo e descontração. Torço muito por cada uma, que Deus as abençoe e retribua todo o bem que fizeram por mim, levarei ótimas recordações desse período... Muito obrigada...*

*Obrigada Aline, Ana Lícia, Ariane, Douglas, Ester, Fabrício, Francesca, Juliana, Juscélia, Laiane, Lara, Loiane, Mário, Matheus, Paula, Paulo Vitor, Rômulo, Rosiane, Thádia, pelo convívio, pelas conversas e favores sempre concedidos.*

*Obrigada familiares e amigos pelo apoio, confiança e carinho concedido...*

*CAPES pelo apoio financeiro.*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
1. INTRODUÇÃO.....	08
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	08
1.1.1. Caracterização.....	08
1.1.2. Estágios de desenvolvimento e ciclo de vida.....	09
1.2. Toxoplasmose e toxoplasmose congênita.....	11
1.3. Resposta imune a <i>T. gondii</i> e susceptibilidade à infecção durante a gestação.....	13
1.4. Gestação e interação entre células maternas e fetais.....	14
1.5. Apoptose e sua regulação na gestação.....	16
1.6. Linhagens celulares: trofoblasto extraviloso humano (HTR-8/SVneo) e monócito humano (THP-1).....	19
JUSTIFICATIVA.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Cultura de células.....	22
3.2. Manutenção <i>in vitro</i> do clone 2F1 de <i>T. gondii</i> .....	22
3.3. Diferenciação de monócitos THP-1 em macrófagos (MØ).....	23
3.4. Tratamento com sobrenadante de macrófagos e infecção de células HTR-8/SVneo.....	23
3.5. Ensaio imunoenzimático de captura (ELISA).....	24
3.5.1. Análise da assinatura de citocinas.....	25
3.6. Índice de apoptose em células HTR-8/SVneo por citometria de fluxo.....	25
3.7. Expressão de Fas/CD95 em células HTR-8/SVneo por citometria de fluxo.....	26
3.8. Análise do índice de Fas solúvel (FasL) por ELISA.....	26
3.9. Análise da proliferação de <i>T. gondii</i> .....	27
3.10. Análises estatísticas.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por <i>T. gondii</i> aumentam a população de células HTR-8/SVneo alto produtoras de IL-6, MIF e TGF- $\beta$ 1.....	28
4.2. Tratamento com meio condicionado de macrófagos e a infecção por <i>T. gondii</i> aumentaram sinergicamente a produção de IL-6 em células HTR-8/SVneo.....	28
4.3. A infecção por <i>T. gondii</i> modula a produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 por macrófagos.....	29
4.4. O estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por <i>T. gondii</i> modulam os índices de apoptose em células HTR-8/SVneo.....	29
4.5. Infecção de células HTR-8/SVneo diminui a expressão de Fas/CD95.....	30
4.6. Infecção de células HTR-8/SVneo e macrófagos induzem a liberação de FasL solúvel (FasL).....	30
4.7. O estímulo com meio condicionado de macrófagos não altera a proliferação de <i>T. gondii</i> em células HTR-8/SVneo.....	31
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	38
7. FIGURAS.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## RESUMO

A interação entre células trofoblásticas extravilosas humanas e macrófagos tem importante papel tanto na implantação quanto na placentação no curso de uma gestação de sucesso. No entanto, alterações nesta comunicação, causada ou não por agentes patogênicos, podem causar problemas gestacionais. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a influência de *Toxoplasma gondii* na ocorrência da apoptose induzida por macrófagos em células trofoblásticas extravilosas humanas. Para este propósito, células trofoblásticas extravilosas da linhagem HTR-8/SVneo foram tratadas ou não com sobrenadante de macrófagos e/ou posteriormente infectadas por *T. gondii*. A secreção de citocinas e a liberação de FasL solúvel foram verificadas pelo ELISA, o índice de apoptose e a expressão de Fas/CD95 foram determinadas por meio do citômetro de fluxo, e a proliferação intracelular do parasito foi analisada pelo ensaio enzimático. Nossos resultados mostraram que a produção de IL-6 por células HTR-8/SVneo foi sinergicamente aumentada na presença de ambos estímulos: sobrenadante de macrófagos e infecção por *T. gondii*. O índice de apoptose de células HTR-8/SVneo infectadas diminuiu na presença ou ausência do sobrenadante de macrófagos infectados. Por outro lado, a apoptose de células HTR-8/SVneo infectadas aumentou quando essas células foram tratadas com o sobrenadante de macrófagos não infectados. Além disso, a baixa expressão de Fas/CD95 e a alta liberação de FasL solúvel foram observadas nessas condições. Finalmente, não foi verificada nenhuma mudança na proliferação de *T. gondii* nas diferentes situações experimentais. No entanto, observa-se uma regulação negativa da apoptose em células HTR-8/SVneo pelo parasito que provavelmente relaciona-se com o favorecimento de seu estabelecimento na célula hospedeira, enquanto as atividades funcionais dos macrófagos foram no sentido de restaurar esses índices de morte celular, para manter os eventos gestacionais de invasão e placentação adequados. Assim, nossos resultados contribuíram para melhor entendimento dos mecanismos de comunicação celular existente entre as células trofoblásticas extravilosas e macrófagos, além de demonstrar que a infecção por *T. gondii* pode interferir nessa interação por meio da modulação da morte celular por apoptose.

**Palavras chaves:** trofoblasto, macrófagos, apoptose, *Toxoplasma gondii*.

## ABSTRACT

The interaction between human extravillous trophoblast cells and macrophages has an important role in the implantation and placentation during a successful pregnancy. However any dysfunction in this communication is associated with pregnancy complications. The aim of this study was investigate the influence of *Toxoplasma gondii* in the occurrence of apoptosis triggered by macrophages in HTR-8/SVneo cells. For this purpose, HTR-8/SVneo cells were treated or not with the supernatant from uninfected or infected macrophages and then infected or not by *T. gondii*. Cytokine secretion and soluble FasL were analyzed by ELISA, apoptosis index and expression of Fas/CD95 were determined by flow cytometry and intracellular parasite proliferation was analyzed by enzymatic assay. IL-6 secretion by HTR-8/SVneo cells was synergistically increased with both stimulus, supernatant from macrophages and *T. gondii* infection. The apoptosis index of infected HTR-8/SVneo cells was decreased in the presence or absence of supernatant from infected macrophage. On the other hand, the apoptosis of infected HTR-8/SVneo cells increased when these cells were treated with supernatant from uninfected macrophages. Also, a low expression of Fas/CD95 and a high soluble FasL release were observed in these conditions. Finally, we did not verify any change in the proliferation of *T. gondii*. However, there is downmodulation of apoptosis in HTR-8/SVneo cells by the parasite which probably relates to favoring its establishment in the host cell, while the functional activities of macrophages toward restoring these death rates cell, to keep gestational events of invasion and placentation appropriate. All together, these results contribute to better understanding of the mechanisms of cellular communication existing between the extravillous trophoblastic cells and macrophages, and demonstrate that infection with *T. gondii* can interfere with this interaction through modulation of cell death by apoptosis.

**Key words:** trophoblastic cells, macrophages, apoptosis, *Toxoplasma gondii*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Toxoplasma gondii*

### 1.1.1. Caracterização

*Toxoplasma gondii* foi identificado primeiramente no roedor *Ctenodactylus gundi*, em 1908 na Tunísia (África) por Nicolle e Manceaux (1908), que assim o nomearam. No mesmo ano, no Brasil, Splendore (1908) também identificou o parasito em um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) (Rey, 2001; Kawazoe, 2005; Dubey *et al.*, 2012). *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que infecta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo quase todos os animais vertebrados de sangue quente (Hunter e Sibley, 2012). Atualmente, *T. gondii* é classificado como pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidia, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma* e espécie *Toxoplasma gondii* (Rey, 2001).

O parasito geralmente apresenta forma alongada e arqueada, mas pode também apresentar um aspecto ovalado, indicando o início de um novo processo de divisão celular (Souza *et al.* 2010). *T. gondii* apresenta um núcleo central situado no meio do parasito ou mais próximo de sua extremidade posterior, organelas comuns às células eucariontes e outras típicas do parasito. Na região anterior é encontrado o complexo apical, caracterizado por uma prega na membrana plasmática demarcando uma depressão central, e logo abaixo dessa região, localiza-se uma organela denominada conóide. Estas estruturas são importantes na manutenção da forma do parasito e também estão envolvidas com a motilidade e direcionamento de vesículas secretórias que auxiliam durante o mecanismo de invasão (Dubey *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2006; Dupont *et al.*, 2012). Ainda associadas ao complexo apical, as micronemas, roptrias e os grânulos densos são organelas responsáveis por secretar fatores químicos relacionadas com a adesão e invasão do parasito à célula hospedeira (Sheiner *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011), bem como formação do vacúolo parasitóforo (Kawazoe, 2005; Carruthers, 2006).

As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas e atuam no reconhecimento e adesão inicial do parasito aos receptores de membrana da célula hospedeira (Souza *et al.* 2010; Carruthers, 2002). As roptrias são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas e seu conteúdo proteico é liberado durante a internalização do parasito na célula hospedeira (Gubbels e Duraisingh, 2012). As proteínas das roptrias ainda estão relacionadas à formação do vacúolo parasitóforo, garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo, ao recrutamento de mitocôndrias (Carruthers, 2002;

Sinai, 2008) e são importantes marcadores de virulência de *T. gondii* (Bradley e Sibley, 2007; Hunter e Sibley, 2012). Os grânulos densos são formados por uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares. Estes grânulos têm como uma das funções a liberação de glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, evitando a sua fusão com lisossomos e possibilitando o parasito evadir de mecanismos de respostas da célula hospedeira (Souza *et al.* 2010; Carruthers e Boothroyd, 2007).

### **1.1.2. Estágios de desenvolvimento e ciclo de vida**

*Toxoplasma gondii* apresenta três estágios de desenvolvimento, sendo todos eles infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (Robert-Gangneux e Darde, 2012). Taquizoítas são caracterizados pela forma alongada, com uma extremidade mais afilada e a outra arredondada (Souza *et al.* 2010; Montoya e Liesenfeld, 2004). Esse estágio infectante é capaz de invadir muitos tipos celulares e multiplicar rapidamente, permitindo o aumento rápido do número de parasitos e consequente disseminação pelo hospedeiro. Em razão disso, esta forma evolutiva é a responsável pelas manifestações da fase aguda da infecção, podendo ocasionar as manifestações clínicas da toxoplasmose (Dubey, 2008; Peng *et al.*, 2011; Hunter e Sibley, 2012).

No organismo hospedeiro, uma vigorosa resposta imune induz a diferenciação de taquizoítas em bradizoítas (Ihara e Nishikawa, 2014; White *et al.*, 2014), que passam a sobreviver em um período de latência, caracterizando a fase crônica da infecção (Robert-Gangneux e Darde, 2012). Nesse estágio, bradizoítas são morfologicamente semelhantes à taquizoítas, mas proliferam mais lentamente devido ao metabolismo mais lento propiciado pela maior quantidade de grânulos de amilopectina (Montoya e Liesenfeld, 2004; Eaton *et al.*, 2006; Skariah *et al.*, 2010). Bradizoítas são encontrados no interior de cistos teciduais formados nos tecidos nervoso, muscular e óptico (Kawazoe, 2005), e pode ser considerada uma forma de resistência do parasito ao sistema imune do hospedeiro. Os cistos podem permanecer nos tecidos por toda a vida do hospedeiro, mas em casos de imunossupressão, a infecção pode reagudizar e os bradizoítas se convertem novamente em taquizoítas, voltando a se multiplicar rapidamente pelo organismo hospedeiro (Skariah *et al.*, 2010; Sullivan e Jeffers, 2012).

Os esporozoítas são encontrados no interior de oocistos. São ovais ou elípticos, quando esporulados, e possuem uma parede dupla muito resistente ao meio ambiente. Quando liberados, juntamente com as fezes dos felinos, são imaturos (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Entretanto, em condições ambientais favoráveis, podem esporular originando dois esporocistos com quatro esporozoítas no interior (Dubey, 2004).

A infecção causada por *T. gondii* pode acometer quase todos os vertebrados, mas apesar desse amplo espectro de hospedeiros, os felinos, mais especificamente do gênero *Felix e Linx*, são os únicos hospedeiros definitivos onde ocorre a reprodução sexuada do parasito (Dubey *et al.*, 1998; Rey, 2001; Kawazoe, 2005).

Felinos se infectam ao ingerirem qualquer uma das formas infectantes (cistos contendo bradizoítas, oocistos contendo esporozoítas ou taquizoítas) iniciando um novo ciclo a partir da infecção das células epiteliais do intestino delgado (Dubey, 2004; Hunter e Sibley, 2012). Geralmente, a infecção se dá pela ingestão de cistos teciduais que, depois de localizados no trato gastrointestinal, sofrem a ação de enzimas proteolíticas que ocasionam a liberação de inúmeros bradizoítas. Estes penetram nas células do estômago e do intestino, convertem em taquizoítas (White *et al.*, 2014) e iniciam a multiplicação, pelo processo de merogonia, originando os merozoítos. Os merozoítos se desenvolvem e podem ser formados dois tipos de gametas: gametas femininos imóveis (macrogametas) e gametas masculinos móveis (microgametas flagelados). Depois da fertilização, uma parede externa envolta do zigoto forma o oocisto imaturo que é liberado para o meio ambiente junto com as fezes dos felinos. No meio ambiente, em condições favoráveis de temperatura e umidade, esse oocisto esporula originando os esporozoítas, e se torna infectante a novos hospedeiros (Hunter e Sibley, 2012; Robert-Gangneux e Darde, 2012; White *et al.*, 2014).

Hospedeiros intermediários, como os humanos, podem se infectar ao ingerir oocistos presentes no solo e que podem contaminar água e alimentos, ingerir cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas ou pelo contato com taquizoítas em infecções transplacentárias, transplantes de sangue ou órgãos contaminados e acidentes laboratoriais (Montoya e Liesenfeld, 2004; Dubey *et al.*, 2012; Esch e Petersen, 2013; Chaudhry *et al.*, 2014).

Uma vez libertos no hospedeiro intermediário, os parasitos podem se diferenciar em taquizoítas, sofrer uma intensa multiplicação por endodiogenia e disseminar pelo organismo hospedeiro, caracterizando a fase aguda da infecção. A fase crônica só tem início com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, ocasionando o encistamento dos taquizoítas no interior das células (diferenciação em bradizoítas) e diminuição da quantidade de parasitos circulantes. Não havendo distúrbios no sistema imunológico, esta fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (Montoya e Liesenfeld, 2004; Kawazoe, 2005; Dubey *et al.*, 2012).

## 1.2. Toxoplasmose e toxoplasmose congênita

A toxoplasmose é causada pela infecção por *T. gondii*. No Brasil, a soroprevalência estimada da doença atinge aproximadamente 77,5% das pessoas (Sepulveda-Arias *et al.*, 2014) e no mundo, estima-se que cerca de 1/3 da população humana apresente a fase crônica da infecção. Assim, a toxoplasmose é uma das mais bem sucedidas doenças parasitárias humanas (Peng *et al.*, 2011; Chaudhry *et al.*, 2014).

A maioria dos portadores da infecção por *T. gondii* é assintomática (Lang *et al.*, 2007; Chaudhry *et al.*, 2014). No entanto, na fase aguda da toxoplasmose, caracterizada pela parasitemia e disseminação do parasito pelo organismo, manifestações clínicas podem surgir como febre, mal estar, mialgia, dores de cabeça, alterações na visão ou até mesmo sua perda total (Montoya e Liesenfeld, 2004; Bodaghi *et al.*, 2012; White *et al.*, 2014). Tais manifestações são recorrentes até que o desenvolvimento da resposta imunológica pelo hospedeiro seja iniciado. Por outro lado, em indivíduos imunocomprometidos, gestantes, crianças e recém-nascidos infectados congenitamente, a toxoplasmose pode gerar vários outros sintomas, especialmente encefalite toxoplásmica, retinocoroidite e abortos (Lambert *et al.*, 2011; Sepulveda-Arias *et al.*, 2014). A fase crônica da infecção se define com o estabelecimento da resposta imune contra o parasito, mas ainda é incapaz de eliminar totalmente o protozoário. Como forma de evasão da resposta imune, o parasito encista e pode permanecer por toda a vida do hospedeiro em estado de latência (Dubey, 2004).

Quando a infecção causada por *T. gondii* é adquirida na gestação, pode resultar no surgimento da toxoplasmose congênita. No Brasil, essa doença é um sério problema de saúde pública (Dubey *et al.*, 2012) e em muitos casos está associada às condições demográficas e socioeconômicas do país, às condições ambientais favoráveis para a exposição desse patógeno, como também à alta exposição de mulheres grávidas aos oocistos (Carellos *et al.*, 2014).

A toxoplasmose congênita pode ocorrer mesmo quando a infecção materna foi adquirida no período pré-concepção (Remington *et al.*, 2001; Kodjikian, 2010). Mas, na maioria das vezes, a transmissão transplacentária do parasito se dá quando a infecção materna por *T. gondii* ocorre durante a gestação, propiciando a toxoplasmose congênita (Kravetz e Federman, 2005; Chaudhry *et al.*, 2014). A primeira situação, mais rara, porém não menos importante, está relacionada aos casos de reativação da infecção crônica como consequência da imunossupressão advinda de tratamentos com corticosteroides ou infecções virais como a AIDS (Lindsay e Dubey, 2011; Chaudhry *et al.*, 2014; Ville e Leruez-Ville, 2014).

Na condição de transmissão transplacentária, se a infecção materna ocorrer no primeiro trimestre gestacional, poucas chances (menos que 6%) de transmissão vertical existem. Entretanto, consequências graves podem ser ocasionadas, por exemplo, o aborto. Diferentemente, se a infecção materna ocorrer durante o terceiro trimestre gestacional, as chances de transmissão transplacentária aumentam muito (entre 60% e 80%), mas as manifestações clínicas nos recém-nascidos são menores ou não existem. Os neonatos, em sua maioria são assintomáticos, mas sequelas tardias podem ser apresentadas como hidrocefalia, microcefalia, calcificação intracraniana, retinocoroidite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardo mental e psicomotor, trombocitopenia e anemia (Montoya e Liesenfeld, 2004; Blanco-Lago *et al.*, 2010; Lindsay e Dubey, 2011; Bodaghi *et al.*, 2012; Chaudhry *et al.*, 2014; Ville e Leruez-Ville, 2014).

### **1.3. Resposta imune a *T. gondii* e susceptibilidade à infecção durante a gestação**

O sistema imunológico no hospedeiro frente a uma infecção pode elaborar respostas tanto da imunidade inata quanto da adaptativa. Contudo, como *T. gondii* é um parasito de hábito obrigatoriamente intracelular, o principal mecanismo de defesa contra esse patógeno é a resposta inflamatória mediada por células (Filisetti e Candolfi, 2004; Maubon *et al.*, 2008).

O parasito pode ser detectado de forma direta através do conjunto de moléculas específicas para detecção de protozoários. Como também podem ser indiretamente detectados pelo reconhecimento de eventuais danos teciduais associados à infecção parasitária (Yarovinsky, 2014). Neste sentido, células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células *natural killer* (NK), estabelecem esse reconhecimento e constituem a primeira linha de proteção contra *T. gondii*. Conseqüentemente, a ativação dessas células de defesa induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- $\gamma$ , que promoverão a ativação de mecanismos efetores antimicrobianos para controle da infecção (Robben *et al.*, 2004; Hunter e Sibley, 2012; Sturge e Yarovinsky, 2014; Yarovinsky, 2014).

Estudos mostram que uma das formas de ativação das APCs se dá pela interação direta com o parasito pelo reconhecimento da profilina, uma proteína essencial para sobrevivência do protozoário que regula sua motilidade e invasão da célula hospedeira. Esse reconhecimento por receptores do tipo *Toll-like receptors* (TLRs), constituintes da membrana dessas células de defesa, leva ao recrutamento da molécula adaptadora MyD88 para o início de uma cascata imune de sinalização. E a ativação dessa cascata de sinalização resulta no aumento na

produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  pelas APCs (Hunter e Sibley, 2012; Sturge e Yarovinsky, 2014; Yarovinsky, 2014).

A produção dessas citocinas está associada com a ativação da resposta imune adaptativa mediada pelos linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>. Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> são células efetoras caracterizadas pela secreção de citocinas envolvidas na resistência do hospedeiro ao parasito e pela atividade citotóxica. Essa atividade torna os linfócitos células efetoras essenciais, pois induzem a apoptose direta contra taquizoítas ou células infectadas (Filisetti e Candolfi, 2004; Melo *et al.*, 2011).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, além de auxiliarem na manutenção da resposta das células TCD8<sup>+</sup>, regulam vários mecanismos imunes contra o parasito (Combe *et al.*, 2005; Jongert *et al.*, 2010). São encontradas diversas subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, que podem ser diferenciados basicamente pelo perfil de citocinas predominante no microambiente em que se encontram. Dentre elas, os linfócitos T helper 1 (Th1) produzem citocinas pró-inflamatórias essenciais para o controle da infecção por patógenos intracelulares; e os linfócitos T helper 2 (Th2) secretam citocinas anti-inflamatórias envolvidas no controle da resposta imune por inibir reações inflamatórias. Estas citocinas, por sua vez, estão envolvidas na indução de outros fatores por células vizinhas e no recrutamento e ativação de mais APCs. Nesse sentido, as células do sistema imune inato e adaptativo se comunicam, e em casos de infecção atuam para intensificar a resposta imunológica efetora contra o patógeno e conter a disseminação da infecção pelo organismo (Abbas e Lichtman, 2007).

Outra importante população de células necessárias para a proteção do hospedeiro é representada pelos macrófagos, pois além de atuar como APC, através da fagocitose e apresentação de antígenos aos linfócitos, secreta IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  que ativa e auxilia as células da imunidade adaptativa (Robben *et al.*, 2004; Hunter e Sibley, 2012; Sturge e Yarovinsky, 2014; Yarovinsky, 2014). A citocina pró-inflamatória IL-12 produzida pelos macrófagos induz os linfócitos a secretarem IFN- $\gamma$ , que é o maior mediador da resistência contra o parasito, promovendo vários mecanismos intracelulares para inibir a multiplicação do parasito (Melo *et al.*, 2011; Dupont *et al.*, 2012; Sturge e Yarovinsky, 2014). A secreção de TNF- $\alpha$  induz a apoptose de células infectadas, aumenta a capacidade microbicida dos macrófagos e induz células NK a secretarem mais IFN- $\gamma$  (Filisetti e Candolfi, 2004; Korner *et al.*, 2010). Além disso, a presença de IFN- $\gamma$  no microambiente regula a expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e espécies reativas do oxigênio (ROS) por macrófagos, que são fatores tóxicos importantes para a eliminação do parasito (Sturge e Yarovinsky, 2014; Yarovinsky, 2014).

No curso da infecção por *T. gondii*, ocorre predominantemente a produção de citocinas pró-inflamatórias. Normalmente, em indivíduos imunocompetentes, nota-se também a presença, não menos importante, mas em menores níveis, das citocinas anti-inflamatórias, para que haja, respectivamente, a proteção contra o patógeno e o controle dessa resposta inflamatória a fim de evitar danos teciduais (Gude *et al.*, 2004). Dessa maneira, se esse perfil de controle da invasão e proliferação do parasito no organismo do hospedeiro for alterado, como por exemplo, durante a gravidez, maiores possibilidades de infecção dos tecidos fetais podem ocorrer (Remington *et al.*, 2001; Kravetz e Federman, 2005; Kodjikian, 2010).

Durante o período gestacional, a resposta imune é marcada pelo balanço entre os perfis pró-inflamatório, essencial nos estágios iniciais e no parto, e predominantemente anti-inflamatório (Vargas-Villavicencio *et al.*, 2009; Salamone *et al.*, 2012), visto que é por meio deste mecanismo preferencialmente anti-inflamatório que o desenvolvimento do feto estará protegido do sistema imunológico materno. Caso o perfil imunológico pró-inflamatório seja expresso exacerbadamente, pode ocorrer rejeição do feto, acarretando abortos recorrentes (Da Silva e Langoni, 2009; Sykes *et al.*, 2012). Neste sentido, se o parasito, que é controlado por um perfil pró-inflamatório, acomete gestantes que, por sua vez, apresentam o padrão de resposta imune predominantemente anti-inflamatório, tanto os riscos de rejeição fetal aumentam quanto os tecidos maternos e fetais se tornam mais susceptíveis à infecção (Abou-Bacar *et al.*, 2004; Sykes *et al.*, 2012).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que células BeWo foram altamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* na presença de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (Barbosa *et al.*, 2008). Adicionalmente, células BeWo apresentaram o parasitismo controlado apenas quando tratadas com altas doses de MIF (Barbosa *et al.*, 2014). IFN- $\gamma$ , citocina pró-inflamatória que deveria controlar a disseminação do parasito, foi incapaz de controlar ambas a invasão e replicação de *T. gondii* em células BeWo (Oliveira *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2008), embora o tratamento destas células com IFN- $\gamma$  tenha controlado a replicação de *Neospora caninum*, parasito altamente semelhante a *T. gondii* (Carvalho *et al.*, 2010). Frente à infecção por *T. gondii*, supõe-se que células trofoblásticas, mesmo sob estímulo pró-inflamatório oferecido por IFN- $\gamma$ , são capazes de modular o perfil imunológico na interface materno-fetal para garantir a manutenção da gestação, mesmo que favoreça infecção fetal por patógenos intracelulares.

#### **1.4. Gestação e interação entre células maternas e fetais**

A gestação é originada a partir da fusão de gametas com materiais genéticos diversos, portanto, é apresentado à mãe, um zigoto com antígenos tanto maternos quanto paternos. Com

isto, certa tolerância imunológica materna em relação aos antígenos paternos é observada e tal condição se torna possível devido ao balanço entre os perfis imunológicos da resposta imune (Gude *et al.*, 2004). O perfil imunológico pró-inflamatório se torna essencial para a implantação embrionária e o parto, enquanto o perfil imunológico anti-inflamatório limita a resposta inflamatória inicial e possibilita a tolerância imunológica frente aos tecidos fetais (Fest *et al.*, 2007; Salamone *et al.*, 2012).

Inúmeras e complexas interações entre o útero receptivo e o blastocisto maduro permitem o sucesso da implantação e, conseqüentemente, o desenvolvimento fetal. Nesse sentido, células trofoblásticas são essenciais por modular, direta ou indiretamente, o perfil tolerogênico essencial para o período gestacional (Chaouat *et al.*, 2010; Yoshinaga, 2010; Salamone *et al.*, 2012). Essas células atuam na supressão/regulação de linfócitos T através da indução da anergia pela secreção de indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO), atua na produção de fatores bloqueadores induzidos por progesterona (PIBF), interagem com receptores das células NK inibindo ou ativando as mesmas (Chaouat *et al.*, 2010), induzem um perfil tolerogênico em células dendríticas (Salamone *et al.*, 2012), recrutam e regulam a atividade de monócitos (Fest *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2013) e modulam a expressão de proteínas imunes em macrófagos (Abumaree *et al.*, 2012).

Os macrófagos exibem uma importante plasticidade funcional e se adaptam reversivelmente de acordo com as mudanças do microambiente (Stout e Suttles, 2004). Estas células são apresentadoras de antígenos, secretoras de citocinas e são mediadoras de resposta em microambientes órgão-específico (Nagamatsu e Schust, 2010b). Quando polarizados em um perfil M2, induzido por fatores anti-inflamatórios secretados pelas células trofoblásticas, os macrófagos apresentam propriedades imunossupressoras que também contribuem para a tolerância imunológica durante a gestação (Abumaree *et al.*, 2012). A decídua é composta basicamente de células deciduais residentes, células imunes e uma ampla variedade de leucócitos, sendo os macrófagos representantes de 20-25% dos leucócitos e aproximadamente 10% das células deciduais no útero grávidico (Nagamatsu e Schust, 2010b). Dessa maneira, esses macrófagos deciduais, além de cooperarem no estabelecimento do perfil anti-inflamatório induzidos pelas células fetais, estão envolvidos também no suporte da invasão do trofoblasto, no remodelamento vascular, na implantação e na placentação (Nagamatsu e Schust, 2010b).

No sítio de implantação, a partir da adesão do blastocisto e contato direto com os tecidos maternos, as células trofoblásticas se diferenciam e passam a apresentar propriedades e funções distintas que estabelecem três novas subpopulações: o citotrofoblasto, o

sinciciotrofoblasto e o trofoblasto extraviloso. O citotrofoblasto é considerado a subpopulação definida pela camada de células trofoblásticas mononucleares em intensa proliferação que circundam o blastocisto e auxiliam no revestimento dos vilos placentários. O sinciciotrofoblasto é originado pela fusão de células do citotrofoblasto diferenciadas e caracteriza-se por ser uma massa celular multinucleada com grande habilidade invasiva que permitirá a implantação do blastocisto no tecido uterino. Por fim, o trofoblasto extraviloso é um citotrofoblasto mononucleado diferenciado que perdeu sua capacidade proliferativa e também adquiriu uma intensa capacidade invasiva (Huppertz *et al.*, 2006).

O trofoblasto extraviloso, em outras palavras, é considerado um citotrofoblasto viloso que, ao extrapolar os limites dos vilos de ancoragem, se diferenciam e passam a invadir a decídua e as artérias espiraladas endometriais (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006). Essas células penetram a parede dos vasos uterinos para remodelar as artérias espiraladas, possibilitar a acomodação dos tecidos extraembrionários e aumentar o suprimento sanguíneo da placenta para o desenvolvimento do feto. A placenta, por ser um órgão dinâmico, está em um constante processo de remodelamento tecidual associado a apoptose de células trofoblásticas. E caso haja um desenvolvimento ou funcionamento anormal desse órgão, complicações gestacionais podem ser observadas (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

Próximo aos trofoblastos extravilosos, no sítio de implantação, pode ser encontrado uma grande concentração de macrófagos deciduais, sugerindo um papel importante dessas células na modulação e comunicação inicial entre células maternas e fetais (Nagamatsu e Schust, 2010b). Essa comunicação se dá pela produção de fatores angiogênicos, citocinas, fatores de crescimento e também pela liberação de FasL que pode diretamente promover a sobrevivência ou a apoptose de células trofoblásticas (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Nagamatsu e Schust, 2010a). Os macrófagos deciduais são vitais não somente na fagocitose de células trofoblásticas apoptóticas, como também estão envolvidos na homeostase tecidual orquestrando a morte e a sobrevivência de células vizinhas no processo de remodelamento tecidual e invasão adequada de células trofoblásticas (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

### **1.5. Apoptose e sua regulação na gestação**

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo ativo em que células desnecessárias ou não funcionais são eliminadas para a manutenção da função normal do tecido (Strasser *et al.*, 2011). Nesse processo, as células morrem sem que haja lise e extravasamento do conteúdo intracelular evitando o acionamento de uma resposta imune competente e danosa às células vizinhas. Em contraste, devido a alterações na membrana

dessas células apoptóticas, ocorre o recrutamento de células fagocíticas que removem os corpos apoptóticos impedindo a ativação de uma resposta inflamatória (Strasser *et al.*, 2011; Happo *et al.*, 2012). Nesse sentido, alterações típicas nas células em apoptose podem ser caracterizadas como a exposição da fosfatidilserina (PS), condensação da cromatina, fragmentação nuclear, clivagem do DNA, desintegração celular e formação de corpos apoptóticos, porém sem extravasamento do conteúdo intracelular prevenindo uma resposta imune local (Strasser *et al.*, 2011).

Dependendo do estímulo, a apoptose pode ser desencadeada por duas vias: intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, ou extrínseca mediada por receptores de morte e em resposta a estímulos exógenos como as citocinas. Os principais executores desse processo são as caspases, uma família de proteínas que clivam várias proteínas vitais para o funcionamento celular ativando a cascata apoptótica. As caspases inicialmente estão na forma inativa, como pró-enzimas, mas podem ser ativadas após clivagem proteica. Essas proteínas apoptóticas podem ser divididas em dois grupos: caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) e caspases executoras/efetoras (caspases 3, 6 e 7). As iniciadoras, como o próprio nome sugere, iniciam o processo pela clivagem e ativação das caspases efetoras e estas, por sua vez, clivam diversos substratos ocasionando as alterações celulares características da apoptose (Favaloro *et al.*, 2012). No entanto, vários fatores endógenos inibitórios como inibidores de apoptose (IAP), proteínas inibitórias *fllice-like* (FLIP) e membros da família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 podem afetar a cascata apoptótica e impedir a propagação do sinal de morte (Gyrd-Hansen e Meier, 2010; Happo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

O processo de apoptose é extremamente importante para o desenvolvimento normal da placenta, uma vez que atua eliminando células desnecessárias sem que haja processo inflamatório local (Huppertz *et al.*, 2006; Fest *et al.*, 2007). Está presente desde os processos de tolerância imune materna, diferenciação de células trofoblásticas, homeostase dos tecidos, até na invasão e transformação das artérias espiraladas pelo trofoblasto (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006; Nagamatsu e Schust, 2010b). No sítio de implantação, é comum encontrar grandes concentrações de macrófagos decíduais próximos aos trofoblastos extravilosos, sugerindo uma importante interação dessas células no remodelamento da decídua (Fest *et al.*, 2007; Nagamatsu e Schust, 2010b).

Qualquer desequilíbrio da produção de citocinas por macrófagos decíduais pode interferir na atividade e sobrevivência do trofoblasto extraviloso, ou vice-versa, e assim gerar disfunções associadas à invasão do trofoblasto (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006; Nagamatsu e Schust, 2010b). Em muitos casos, a invasão superficial por

trofoblastos associados a índices exagerados de apoptose, possivelmente induzidos por macrófagos, acarreta graves complicações gestacionais (Wu *et al.*, 2012). A preeclampsia, a restrição de crescimento intrauterino (IUGR), partos prematuros, abortos espontâneos e descolamento da placenta são todos exemplos de complicações ocasionadas por uma invasão superficial da decídua pelo trofoblasto (Kaufmann *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2007; Whitley *et al.*, 2007; Petsas *et al.*, 2012). Da mesma maneira, a excessiva invasão pelo trofoblasto no endométrio pode contribuir para patologias como a placenta acreta, causada pelo contato direto do tecido viloso com o miométrio subjacente. A interação deficiente entre macrófagos e trofoblastos durante a placentação, resultando numa circulação uteroplacentária anormal, induz a uma profunda invasão pelo trofoblasto no útero e promove a aderência da placenta (Tantbirojn *et al.*, 2008). Portanto, qualquer alteração no evento de apoptose em células trofoblásticas podem causar danos no desenvolvimento embrionário ou até a morte do embrião (Levy e Nelson, 2000; Whitley *et al.*, 2007).

Infecções ocasionadas por patógenos, como *T. gondii*, também podem alterar o diálogo existente entre macrófagos e trofoblasto e, conseqüentemente, modular o programa apoptótico das células trofoblásticas essenciais para o sucesso da gestação. Várias adaptações possibilitaram a sobrevivência desse patógeno no meio intracelular (Sinai *et al.*, 2004; Sinai, 2008; Boyle e Radke, 2009), uma vez que o parasito é capaz de interferir nas vias de apoptose da célula hospedeira como modo de evasão do sistema imunológico (Boothroyd, 2009). Todavia, a interferência de *T. gondii* na incidência de apoptose está relacionada ao tipo de cepa do parasito (Angeloni *et al.*, 2009).

Evidências experimentais sugerem que *T. gondii* inibe a apoptose da célula hospedeira pela capacidade de diminuir a ativação das caspases efetoras através da interferência em várias outras cascatas de ativação (Vutova *et al.*, 2007; Luder *et al.*, 2009). Além disso, essa capacidade de evasão dos mecanismos de imunidade do hospedeiro podem estar associados à modulação de sinais anti-apoptóticos (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2012), ao estímulo da expressão de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (Molestina *et al.*, 2003), à alteração da expressão de Fas/FasL indutores de apoptose (Luder e Gross, 2005; Lang *et al.*, 2007), à inibição das vias intrínseca e extrínseca da apoptose através do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Rodrigues *et al.*, 2012) ou também através dos sinais transdutores e ativadores da transcrição (STAT3) (Cai *et al.*, 2014). Enfim, o bloqueio da apoptose permite a sobrevivência da célula hospedeira para o desenvolvimento e proliferação de *T. gondii* no meio intracelular (Santos *et al.*, 2011). Desse modo, a desregulação do processo apoptótico pode resultar em um processo infeccioso intenso podendo levar o hospedeiro a morte (Lang *et al.*,

2007; Rodrigues *et al.*, 2012) e durante a gestação aumentar os riscos de rejeição fetal (Abou-Bacar *et al.*, 2004).

### **1.6. Linhagens celulares: trofoblasto extraviloso humano (HTR-8/SVneo) e monócito humano (THP-1)**

Para melhor compreender o papel do trofoblasto na imunologia da gestação e, especialmente, na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando-se de linhagens celulares pré-estabelecidas. As células trofoblásticas extravilosas humanas (linhagem HTR-8/SVneo), modificadas em 1993, foram isoladas e transfectadas com um plasmídeo contendo um gene com o antígeno T (Tag) do vírus símio 40 (SV40) para permitir a habilidade de proliferar indefinidamente, mas manter as características fenotípicas das células parentais não transfectadas (Graham *et al.*, 1993). Desse modo, estas células são utilizadas em estudos como modelo para o entendimento do funcionamento placentário e invasão do trofoblasto (Jovanovic e Vicovac, 2009; Suman e Gupta, 2012).

As células mielomonocíticas humanas de linhagem THP-1 foram primariamente isoladas do sangue periférico de uma criança do sexo masculino com um ano de idade e quadro de leucemia monocítica aguda. Essas células se multiplicam facilmente, se mantêm em cultura e são amplamente utilizadas como modelos de monócitos do sangue (Tsuchiya *et al.*, 1980). Pelo fato de possibilitar a sua transformação *in vitro* em macrófagos (Schwende *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2007), aspectos da interação de macrófagos, células trofoblásticas e *T. gondii* podem simular as consequências da interferência do parasito nessa comunicação celular essencial para o sucesso da gestação (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

### **JUSTIFICATIVA**

A interação das células trofoblásticas extravilosas e macrófagos é essencial durante o período gestacional. O remodelamento da decídua e a invasão das artérias espiraladas, que garantirão um suprimento sanguíneo adequado para o desenvolvimento do feto, assim como a indução da apoptose de células trofoblásticas por macrófagos para homeostase tecidual, são importantes atividades controladas pela interação entre essas células (Fest *et al.*, 2007; Nagamatsu e Schust, 2010b; Wu *et al.*, 2012). No entanto, tais atividades só podem ser concretizadas pela indução e secreção de citocinas e fatores solúveis que desencadearão na ativação de processos apoptóticos extremamente importantes para o desenvolvimento normal da placenta (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Fest *et al.*, 2007).

Alterações nessa interação celular podem estar associadas com complicações na gestação e no desenvolvimento fetal. Infecções, como a causada por *T. gondii*, podem interferir nesses processos celulares, alterando o curso da gestação. *T. gondii* é capaz de alterar a ocorrência de morte celular, por apoptose, em células trofoblásticas (Angeloni *et al.*, 2009), como também sua presença pode influenciar no perfil de citocinas secretadas, acarretando na modulação de várias atividades celulares (Hunter e Sibley, 2012). Assim, qualquer desequilíbrio no perfil de citocinas, ou nos índices de apoptose influenciados por um patógeno, ou não, poderá levar a complicações na gestação (Nagamatsu e Schust, 2010b).

A imunomodulação materna durante o período gestacional e o desenvolvimento fetal é essencial, no entanto, a interferência da infecção por *T. gondii* pode alterar o sucesso dessa comunicação celular. Assim, este estudo visou contribuir para o entendimento de interações que se estabelecem entre macrófagos e trofoblasto extraviloso em presença do *Toxoplasma gondii* como modelo de uma interface materno-fetal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Analisar a influência da infecção pela cepa 2F1 de *T. gondii* na interação entre macrófagos humanos (macrófagos derivados de monócitos THP-1 (MØ)) e trofoblasto extraviloso humano (HTR-8/SVneo).

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a secreção das citocinas TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , MIF, IL-10 e IL-6 em células HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e/ou estimuladas com sobrenadante de MØ infectados ou não por *T. gondii*.

- Avaliar a secreção das citocinas TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , MIF, IL-10 e IL-6 em MØ infectados ou não por *T. gondii*.

- Avaliar o índice de apoptose de células HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e/ou estimuladas com sobrenadante de MØ infectados ou não por *T. gondii*.

- Avaliar a expressão de Fas/CD95 em células HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e/ou estimuladas com sobrenadante de MØ infectados ou não por *T. gondii*.

- Avaliar a liberação de FasL em MØ infectados ou não por *T. gondii*.

- Avaliar a liberação de FasL em células HTR-8/SVneo infectadas ou não por *T. gondii* e/ou estimuladas com sobrenadante de MØ infectados ou não por *T. gondii*.

- Avaliar a proliferação por *T. gondii* em células HTR-8/SVneo previamente estimulados ou não com sobrenadante de MØ infectados ou não pelo mesmo parasito.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultura de células

A linhagem celular HTR-8/SVneo, originada do citotrofoblasto extraviloso humano, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Estas células foram previamente imortalizadas pela transfecção de células trofoblásticas extravilosas de primeiro trimestre de gestação com um plasmídeo contendo o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (Graham *et al.*, 1993). Já os mielomonócitos humanos (linhagem THP-1) foram adquiridos do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e ambas linhagens foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> ou 75cm<sup>2</sup> (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) contendo meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e 1% de antibióticos (10.000 U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

O repique das células HTR-8/SVneo foi realizado a cada dois dias. As células foram lavadas com meio de cultura novo e em seguida foi adicionado ao frasco solução de tripsina contendo 0,25% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma) por 5 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse procedimento, as células foram lavadas e retiradas dos frascos de cultura com uso de meio a 10% de soro, transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1mL de meio com soro e distribuído em novos frascos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento (90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)).

As células THP-1, em suspensão, foram repicadas a cada três dias. Com este propósito, as células foram retiradas dos frascos de cultivo, diretamente transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1mL de meio com soro e distribuído em dois novos frascos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento (90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)).

#### 3.2. Manutenção *in vitro* do clone 2F1 de *T. gondii*

Os taquizoítas do clone 2F1 de *T. gondii*, originados da cepa RH e que expressam o gene da enzima  $\beta$ -galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos em células HeLa (ATCC) cultivadas de modo similar às células HTR-8/SVneo, no entanto em meio RPMI suplementado com 2% de SBF. À medida que a maioria das células HeLa encontrava-se lisada pelo parasito, o meio do frasco de cultivo contendo parasitos livres em suspensão foi transferido para tubos de 15mL e centrifugado a 400 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. O “pellet” contendo os parasitos foi ressuspensão em 1mL de meio de cultivo e distribuído em dois novos frascos contendo células não infectadas.

### **3.3. Diferenciação de monócitos THP-1 em macrófagos (MØ)**

As células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos por intermédio de tratamento com 10ng/mL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Biogen Com. Dist. Ltda, Sumarezinho, SP, Brasil). Estas células foram mantidas em frascos de 75cm<sup>2</sup> contendo 1x10<sup>6</sup> células em 15mL de meio a 10% SBF e 1,5 $\mu$ L de PMA a 10 ng/mL por 72h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (Park et al. 2007). Após a diferenciação, os macrófagos foram lavados com meio de cultura novo e foi adicionada solução de tripsina por 5 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse procedimento, as células foram lavadas e retiradas dos frascos de cultura com uso de meio a 10% de soro, transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1mL de meio com soro e utilizadas nos futuros procedimentos experimentais.

### **3.4. Tratamento com sobrenadante de macrófagos e infecção de células HTR-8/SVneo**

Numa primeira etapa de experimentos, os macrófagos obtidos por diferenciação, como acima descrito, foram cultivados em placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) na proporção de 1x10<sup>5</sup> células a cada 200 $\mu$ L por poço, em meio a 10% SBF a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por célula (3:1) ou incubadas apenas com meio (controle). Após incubação por 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10min) e o sobrenadante livre de células foi coletado e estocado a -80°C para posterior ensaio de detecção de citocinas e FasL solúvel ou tratamento das células HTR-8/SVneo. O sobrenadante dos macrófagos infectados ou não foram denominados de meio condicionado.

Numa segunda etapa de experimentos, as células HTR-8/SVneo foram cultivadas em placas de 6 poços (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA) (1x10<sup>6</sup>

células/2000 $\mu$ L/poço) em meio a 10% SBF por 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e, em seguida, as células foram tratadas com 1,5 mL de sobrenadante de macrófagos infectados ou não (meio condicionado) e 500 mL de meio novo por adicionais 24h. Como controle, células HTR-8/SVneo foram cultivadas apenas com meio por 24h. Após esses estímulos, o sobrenadante de HTR-8/SVneo tratadas ou não com meio condicionado foi removido e as células foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) e incubados por mais 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10 min), o sobrenadante livre de células foi coletado e estocado a -80°C para detecção da secreção de citocinas ou FasL solúvel. Adicionalmente, as células foram coletadas para verificar o índice de apoptose e a expressão de Fas/CD95 por citometria de fluxo.

### 3.5. Ensaio imunoenzimático de captura (ELISA)

As concentrações de TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , MIF, IL-10 e IL-6 foram mensuradas por ELISA de captura nos sobrenadantes de células HTR-8/SVneo ou macrófagos obtidos como descritos no item 3.4, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Brevemente, as placas de alta afinidade de 96 poços (Corning Incorporated, NI, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-citocinas humanas por 12 horas a temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) - Tween (PBS-T 0,05%) e bloqueadas durante 1h a temperatura ambiente com PBS mais 1% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma) para a citocina MIF ou PBS-T mais 10% de SBF para as demais citocinas. Após novas lavagens em PBS-T, 50 $\mu$ l das curvas de cada citocina (de 300pg/mL a 4,7pg/mL para IL-6 e IFN- $\gamma$ ; de 500pg/mL a 7,8 pg/mL para IL-10; de 4000pg/mL a 62,5pg/mL para MIF; e de 8000pg/mL a 125pg/mL para TGF- $\beta$ 1) e 50 $\mu$ l das amostras de sobrenadantes de células HTR-8/SVneo ou macrófagos foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, a placa para detecção de MIF foi incubada com anticorpo de detecção anti-citocina humana conjugado com biotina durante 2h a temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina/peroxidase foi adicionada à placa e permaneceu em incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Já as demais placas foram incubadas com o anticorpo de detecção anti-citocinas humanas conjugados com biotina e estreptavidina/peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB (BD Biosciences) mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA).

No ensaio de detecção para TGF- $\beta$ 1, os sobrenadantes foram primeiramente tratados com soluções de ácido e base para ativar a citocina presente na amostra, uma vez que TGF- $\beta$ 1 é secretado pelas células como um complexo inativo. O tratamento procedeu-se da seguinte forma: 2 $\mu$ L de HCl 1N foi misturado aos 50 $\mu$ L de sobrenadante e incubado por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, 2 $\mu$ L de NaOH 1N foi adicionada aos sobrenadantes previamente incubados com HCl para neutralizar a ação do ácido e, em seguida, as amostras foram colocadas nas placas de ELISA.

### **3.5.1. Análise da assinatura de citocinas**

Uma análise complementar “não convencional” dos resultados relacionados às dosagens de citocinas por ELISA foi utilizada para avaliar o perfil de citocinas no sobrenadante de cada condição experimental, usando um conceito geral de “baixos” e “altos” secretores de citocinas (Silva *et al.*, 2011). Para esse propósito, o conjunto geral dos dados de concentrações de citocinas nos sobrenadantes (pg/mL) detectados para todos os grupos experimentais foram usados para calcular o valor da mediana global para cada citocina. O valor global da mediana foi utilizado como ponto de corte (*cut-off*) para o sobrenadante individual que apresentou “baixo” ou “alto” nível de citocina. A seguir, a frequência (%) do sobrenadante mostrando os “altos níveis de citocina” (acima da mediana global de corte) foi calculado no sentido de determinar a percentagem das condições experimentais que apresentaram níveis elevados da citocinas. A análise comparativa da assinatura de citocinas foi realizada utilizando 50% para identificar as citocinas consideradas relevantes em cada condição. A fim de destacar as diferenças relevantes entre os grupos experimentais, foram utilizados retângulos para distinguir a assinatura de citocinas. Esta abordagem se mostrou relevante para detectar mudanças sutis na assinatura de citocinas não detectáveis pelos métodos estatísticos convencionais (Castro *et al.*, 2013).

### **3.6. Índice de apoptose em células HTR-8/SVneo por citometria de fluxo**

O índice de apoptose foi mensurado usando o kit de Detecção de Apoptose FITC Anexina V de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). Brevemente, as células HTR-8/SVneo, cultivadas como descrito no item 3.4, foram destacadas das placas, lavadas com PBS gelado, transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 400 x g por 5min. Em seguida, as células foram homogeneizadas com o tampão de ligação 1x, a concentração celular foi ajustada para 1x10<sup>5</sup> células/100 $\mu$ L e as células transferidas para tubos de poliestireno de 15x75mm (BD Biosciences). Foram adicionados 5 $\mu$ L de FITC/Anexina V

e/ou 5µL da solução de marcação Iodeto de Propídio, então as células foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 15min ao abrigo da luz. Após a dupla marcação, foi adicionado o tampão de ligação 1x e a fluorescência de 20000 células de cada condição experimental foi analisada pelo citômetro FACSCalibur BD™ (BD Company, San Diego, CA, EUA) dentro de 1h. Os resultados obtidos da análise pela citometria foram representados por *dot plot* e gráficos de barra.

### **3.7. Expressão de Fas/CD95 em células HTR-8/SVneo por citometria de fluxo**

Células HTR-8/SVneo, cultivadas como descrito no item 3.4, foram removidas das placas, lavadas com PBS gelado estéril, transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 400 x g, 4°C por 7 minutos. Em seguida, as células foram homogeneizadas em PBS com 0,5% de BSA (Sigma), a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^5$  células/100µL e as células transferidas para tubos de poliestireno de 15x75mm (BD Biosciences). Foram adicionados 5µL do anticorpo monoclonal anti-CD95 conjugado com PE (Sigma) ou 5µL do isotipo controle IgG de camundongo irrelevante (Milipore, São Paulo, SP, Brasil) para controle da reação, os tubos foram homogeneizados e incubados a 4°C por 30min ao abrigo da luz. Após a marcação, foi adicionado 1mL de PBS com 0,5% BSA (Sigma) em cada tudo e os mesmos foram centrifugados por a 400 x g, por 7 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 300µL de fixador contendo paraformaldeído e cacodilato de sódio. Em seguida foi realizada a leitura de 20000 células de cada condição experimental no citômetro FACSCalibur BD™ (BD Company). Os resultados obtidos da análise pela citometria foram representados por histograma e gráficos de barra.

### **3.8. Análise do índice de Fas solúvel (FasL) por ELISA**

FasL solúvel foi mensurado nos sobrenadantes de células HTR-8/SVneo ou macrófagos (obtidos como descritos no item 3.4), utilizando o kit ELISA Fas Ligante (FasL) humano de acordo com as instruções do fabricante (Sigma). Brevemente, foram adicionadas na placa já sensibilizada 100µL da curva (de 1000pg/mL a 1,37pg/mL) e 100µL das amostras de sobrenadantes de células HTR-8/SVneo ou macrófagos, e incubados por 2,5 ha temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, a placa foi incubada com anticorpo de detecção anti-FasL humano conjugado com biotina durante 1h a temperatura ambiente e, depois deste intervalo, estreptavidina/peroxidase foi adicionada à placa e permaneceu em incubação por 45 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB mais 0,2M de ácido sulfúrico por 30 minutos

e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus).

### 3.9. Análise da proliferação de *T. gondii*

Células HTR-8 foram cultivadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/200 $\mu$ L/poço) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24h e, após esse período, foram estimuladas com meio condicionado ou meio completo (controle) por adicionais 24h. Subsequentemente, os sobrenadantes foram removidos e as células HTR-8/SVneo foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) e incubadas novamente por 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10min), lavadas com PBS contendo 1mM CaCl<sub>2</sub> e 1mM MgCl<sub>2</sub> e o ensaio de proliferação de *T. gondii* (2F1) foi realizado (Teo *et al.*, 2007). Foram adicionados às células 100 $\mu$ L de tampão de lise (100mM HEPES, pH 8,0, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, 5mM ditiotretitol), 160 $\mu$ L de tampão de ensaio (100mM tampão fosfato, pH7,3, 102mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 9mM MgCl<sub>2</sub>) e 40 $\mu$ L do substrato CPRG (clorofenol red- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) e as mesmas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após este período, a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase foi mensurada a 570nm usando leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus).

Paralelamente, uma curva padrão por meio de diluições seriadas foi construída em duplicata utilizando taquizoítas de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a  $1 \times 10^6$ /50 $\mu$ L. À curva padrão também foram adicionadas as soluções tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato CPRG e a DO foi mensurada como descrito. Os dados foram apresentados como proliferação de *T. gondii* em relação à curva padrão.

### 3.10. Análises estatísticas

Todos os resultados foram obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de múltipla comparação Bonferroni ou Kruskal Wallis, e as diferenças entre duplas foram analisadas pelo teste *t* de Student. A análise estatística foi determinada usando o programa GraphPad Prisma versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Diferenças significantes foram definidas com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estímulo com meio condicionado de macrófagos anterior à infecção por *T. gondii* aumentam a população de células HTR-8/SVneo alto secretoras de IL-6, MIF e TGF- $\beta$ 1

Para verificar a influência do sobrenadante de macrófagos e/ou da infecção por *T. gondii* na secreção de citocinas por células HTR-8/SVneo, realizou-se a dosagem de citocinas por ELISA em sobrenadantes de cultura de células HTR-8/SVneo estimuladas ou não com meio condicionado e infectadas ou não por *T. gondii*. Os dados foram representados por meio de uma análise complementar de assinatura de citocinas que permitiu avaliar o perfil de citocinas no sobrenadante de cada condição e detectar mudanças sutis não detectáveis pelos métodos convencionais (Figura 1).

A análise da assinatura de citocinas revelou que células HTR-8/SVneo não tratadas e não infectadas mostraram ser alto secretoras de TGF- $\beta$ 1 e baixo secretoras de IL-6, IFN- $\gamma$  e MIF. Após o estímulo com sobrenadante de macrófagos infectados ou não, as células HTR-8/SVneo apresentaram baixa frequência na secreção de todas as citocinas analisadas (Figura 1A).

Por outro lado, células HTR-8/SVneo quando não estimuladas e infectadas mostraram ser alto secretoras de IL-6, enquanto células infectadas estimuladas com sobrenadante de macrófagos não infectados apresentaram maior frequência da população celular alto secretoras de IL-6 e MIF. Além disso, o tratamento com meio condicionado de macrófagos infectados anterior a infecção das células HTR-8/SVneo resultou em uma maior frequência de secreção de IL-6, MIF e também TGF- $\beta$ 1 (Figura 1B).

### 4.2. Estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por *T. gondii* aumentam sinergicamente a secreção de IL-6 por células HTR-8/SVneo

Após a análise pela assinatura de citocinas, foram verificadas, pelo método convencional, as concentrações das mesmas no sobrenadante de células HTR-8/SVneo de acordo com as condições experimentais citadas anteriormente. Embora mais que 50% da população de células HTR-8/SVneo foram alto secretoras de MIF e TGF- $\beta$ 1 na presença do tratamento com meio condicionado de macrófagos e infecção (Figura 1B), células HTR-8/SVneo não mostraram diferenças significativas dos níveis de secreção dessas citocinas quando comparado com as células tratadas ou não e não infectadas (Figura 2A-C).

Entretanto, células HTR-8/SVneo não infectadas e estimuladas com o sobrenadante de macrófagos secretaram aumentados níveis de IL-6, independentemente da infecção dos macrófagos. Assim também ocorreu em células HTR-8/SVneo infectadas após o estímulo

pelo meio condicionado de macrófagos, apresentando maiores níveis de produção de IL-6. Além disso, pode-se observar que o tratamento com meio condicionado e a infecção das células HTR-8/SVneo induziram a secreção de IL-6 demonstrando um aumento sinérgico propiciado pelo estímulo condicionado e pela infecção por *T. gondii* (Figura 2D).

#### **4.3. Infecção por *T. gondii* modula a secreção de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 por macrófagos**

No sentido de verificar uma possível modulação das células HTR-8/SVneo influenciada pelo sobrenadante dos macrófagos infectados ou não por *T. gondii*, realizou-se a dosagem de citocinas por ELISA em sobrenadantes de cultura de macrófagos (Figuras 3). Macrófagos infectados secretaram maiores níveis de IFN- $\gamma$  (Figura 3A) e menores níveis de IL-6 (Figura 3D) e IL-10 (Figura 3E) quando comparados com células não infectadas. Os níveis de TGF- $\beta$ 1 (Figura 3B) e MIF (Figura 3C) também foram analisados, mas não foram verificadas diferenças significativas com relação às células não infectadas.

#### **4.4. Estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por *T. gondii* modulam os índices de apoptose em células HTR-8/SVneo**

O índice de apoptose também foi analisado, na intenção de avaliar se o meio condicionado de macrófagos, assim como a infecção por *T. gondii*, interferiram nos níveis de apoptose em células HTR-8/SVneo (Figura 4).

Primeiramente, foi avaliada a exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática de células HTR-8/SVneo com o objetivo de determinar estágios iniciais de apoptose. Como resultado, células HTR-8/SVneo não infectadas e estimuladas com o meio condicionado de macrófagos, independentemente da infecção, apresentaram maior expressão de fosfatidilserina quando comparado às células não tratadas e não infectadas. Em adição, células HTR-8/SVneo não tratadas e infectadas também apresentaram maior expressão de fosfatidilserina quando comparado às células não tratadas e não infectadas. Por outro lado, o tratamento com o meio condicionado de macrófagos infectados em células HTR-8/SVneo infectadas diminuiu a expressão de fosfatidilserina quando comparados as células HTR-8/SVneo tratadas com meio condicionado não infectado ou ainda quando comparadas com células HTR-8/SVneo infectadas e não tratadas (Figuras 4A,C).

Os estágios finais de apoptose foram determinados pela exposição de fosfatidilserina para o lado externo da membrana associada com os dados de ruptura de membrana. Dessa maneira, células HTR-8/SVneo não infectadas, quando estimuladas com o meio condicionado

de macrófagos independentemente da infecção destas células, apresentaram maiores índices de apoptose quando comparado às células não tratadas e não infectadas.

Entretanto, a infecção por *T. gondii* de células HTR-8/SVneo induziu menores índices de apoptose quando comparados às células não tratadas e não infectadas. O tratamento com meio condicionado de macrófagos infectados em células HTR-8/SVneo infectadas também reduziram os índices de apoptose quando comparados às células HTR-8/SVneo não infectadas e estimuladas com mesmo tratamento. Estas células também apresentaram redução nos níveis de apoptose quando comparadas às células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com sobrenadante de macrófagos não infectados. Interessantemente, quando as células HTR-8/SVneo infectadas foram estimuladas, com meio condicionado não infectado os índices de apoptose aumentaram quando comparados com as células infectadas, não estimuladas e com células não infectadas e estimuladas com mesmo tratamento (Figuras 4B e C).

#### **4.5. Infecção por *T. gondii* de células HTR-8/SVneo diminui a expressão de Fas/CD95**

A fim de verificar se os índices de apoptose relaciona-se à expressão de receptores de morte expressos pelas células, a expressão do receptor de morte Fas/CD95 foi analisada nas células HTR-8/SVneo após o estímulo com meio condicionado de macrófagos e/ou infecção por *T. gondii*. Células HTR-8/SVneo não infectadas e estimuladas com meio condicionado de macrófagos (infectados ou não) demonstraram maior expressão de Fas/CD95 em relação às células sem tratamento e sem infecção. Sendo que dentre as condições de estímulos e na ausência de infecção, células HTR-8/SVneo tratadas com meio condicionado infectado induziram uma maior expressão do receptor de morte quando comparado às células tratadas com sobrenadante de macrófagos não infectados (Figuras 5A e B).

Por outro lado, a infecção das células HTR-8/SVneo inibiram a expressão do receptor Fas/CD95 em todas as situações experimentais quando comparadas às mesmas condições na ausência da infecção. Adicionalmente, o tratamento com meio condicionado infectado intensificou a inibição da expressão dos receptores de morte Fas/CD95 em células HTR-8/SVneo. Contudo, pode-se observar que o tratamento com meio condicionado de macrófagos não infectados das células HTR-8/SVneo infectadas tiveram maior expressão deste receptor que as outras condições infectadas (Figuras 5A e B).

#### **4.6. Infecção por *T. gondii* de células HTR-8/SVneo e macrófagos induzem a liberação de FasL solúvel (FasL)**

A liberação de FasL solúvel também foi mensurada no sobrenadante de macrófagos e células HTR-8/SVneo para avaliar a influência desses mediadores na indução da apoptose no trofoblasto extraviloso. Os resultados mostraram que a infecção por *T. gondii* intensificaram a liberação de FasL por macrófagos quando comparados às células não infectadas (Figura 6A).

Da mesma forma, o tratamento com meio condicionado de macrófagos, independentemente da infecção, em células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* aumentou os índices de liberação de FasL solúvel quando comparado ao controle não estimulado bem como quando comparadas às células da mesma condição experimental na ausência da infecção. Apesar de não haver diferenças estatísticas relacionadas às condições não infectadas, observou-se uma tendência de aumento da liberação de FasL solúvel quando as células HTR-8/SVneo foram tratadas com meio condicionado (Figura 6B).

#### **4.7. Estímulo com meio condicionado de macrófagos não altera a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo**

Para verificar se o estímulo com sobrenadante de macrófagos, infectados ou não por *T. gondii*, interfere na proliferação intracelular do parasito no trofoblasto extraviloso, foi realizado um ensaio de proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo.

O estímulo de células HTR-8/SVneo com meio condicionado de macrófagos, previamente infectados ou não por *T. gondii*, não induziu alteração significativa na proliferação intracelular do parasito, embora uma ligeira tendência de aumento do parasitismo foi detectada quando comparado às células HTR-8/SVneo não tratadas (Figura 7).

## 5. DISCUSSÃO

Macrófagos decíduais apresentam importante função durante os estágios iniciais da gestação em humanos e são a primeira fonte de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a manutenção apropriada do microambiente na interface materno-fetal (Hunt, 1989). No sítio de implantação, ao redor das células trofoblásticas invasivas, existe uma grande concentração de macrófagos envolvidos na modulação da comunicação inicial entre células fetais e maternas (Nagamatsu e Schust, 2010b). Nesse sentido, macrófagos podem cooperar com as células trofoblásticas para garantir invasão, remodelação vascular, implantação e placentação contribuindo para o sucesso gestacional (Szekeres-Bartho, 2002; Seavey e Mosmann, 2008). Entretanto, uma infecção causada por um agente patogênico, como *T. gondii*, pode interferir nessa condição normal e no desenvolvimento da gestação (Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

No presente estudo, foi mostrado que a infecção por *T. gondii* e o estímulo com meio condicionado de macrófagos aumentam a população de células HTR-8/SVneo alto produtoras das citocinas IL-6, TGF- $\beta$ 1 e MIF. Além disso, a própria infecção por *T. gondii* “*per se*” é capaz de aumentar a população de células HTR-8/SVneo alto produtoras de IL-6. Estes dados podem estar associados a uma estratégia usada pelo parasito para reduzir a morte celular, uma vez que essas citocinas são capazes de modular negativamente o processo apoptótico. Nossos estudos prévios demonstraram que células BeWo infectadas por *T. gondii* e tratadas com as formas recombinantes das citocinas IL-6, TGF- $\beta$ 1 ou IL-10 reduziram o índice de apoptose nestas células (Angeloni *et al.*, 2013). Além disso, MIF também pode agir modulando a apoptose pela via dependente de p53 (Bevilacqua *et al.*, 2014). IL-6 também pode bloquear o processo apoptótico pela ativação de ERK1/2 e NF- $\kappa$ B, ambas as proteínas de sinalização intracelular que igualmente estão relacionadas à inibição de apoptose (Naugler e Karin, 2008; Tu *et al.*, 2012). Finalmente, TGF- $\beta$ 1 é capaz de controlar o processo de morte celular pela inibição do receptor de morte Fas/CD95 (Aschkenazi *et al.*, 2002). Estes dados da literatura corroboram com nossos resultados, uma vez que demonstramos um menor índice de apoptose em células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas ou não com meio condicionado de macrófagos infectados, o que coincide com uma maior população celular alto produtora de IL-6, TGF- $\beta$ 1 e MIF.

Embora as células HTR-8/SVneo mostraram ser alto produtoras de MIF e TGF- $\beta$ 1, as concentrações destas citocinas não são diferentes estatisticamente quando comparado às células não tratadas. Aqui nota-se a importância da assinatura de citocinas, mostrando que, mesmo não havendo diferenças significativas quando analisadas as concentrações das

citocinas nos sobrenadantes dessas células, é possível observar um aumento da população celular produtora desses fatores inflamatórios. Este tipo de análise de citocinas “não convencional” já foi realizado por estudos anteriores e demonstrou a importância biológica em se evidenciar a frequência de células alto produtoras de citocinas, mesmo que não haja diferenças estatísticas na concentração das mesmas citocinas (Silva *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013). Neste sentido, uma maior quantidade de células produzindo concentrações similares de citocinas pode apresentar um importante espectro de ação e influenciar mais células vizinhas da interface materno-fetal. Mesmo que a população celular de HTR-8/SVneo não tenha mostrado ser alto produtora de IL-6 na ausência da infecção por *T. gondii*, o estímulo com o meio condicionado assim como a infecção pelo parasito foram suficientes para aumentar os níveis de IL-6. A maior concentração de IL-6 detectada pela análise convencional do ELISA, foi exatamente na condição com menor apoptose e expressão de Fas/CD95. Assim, tanto o meio condicionado quanto a infecção por *T. gondii* aumentaram sinergicamente a quantidade de células secretoras de IL-6 bem como as concentrações desta citocina no sobrenadante de células HTR-8/SVneo.

Na decídua, uma variedade de populações celulares incluindo macrófagos, citotrofoblastos, trofoblastos extraviloso e células estromais são produtoras de IL-6. Em concordância com nossos resultados, alguns estudos sugerem que diferentes tipos celulares podem trabalhar sinergicamente para aumentar a secreção de IL-6 (Champion *et al.*, 2012). IL-6 é essencial para o processo de implantação embrionária (Robertson *et al.*, 2010). Além disso, a produção desta citocina é capaz de estimular vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição como STAT3 (Fitzgerald *et al.*, 2005) e afetar a produção de citocinas envolvidas na função migratória, na regulação da invasão do trofoblasto e na fisiologia dessas mesmas células (Jovanovic e Vicovac, 2009; Dubinsky *et al.*, 2010). Nossos resultados sugerem que o estímulo de macrófagos induzem a secreção de IL-6 por células HTR-8/SVneo no sentido de promover um estímulo apropriado que facilitaria o crescimento e a invasão desta população de células trofoblásticas na decídua materna. Os altos níveis da produção de IL-6 em células HTR-8/SVneo infectadas também pode sugerir um mecanismo orquestrado pelo parasito em inibir a incidência de apoptose e evadir da resposta imune do hospedeiro, uma vez que esta citocina apresenta característica anti-apoptótica (Naugler e Karin, 2008; Tu *et al.*, 2012).

No sentido de identificar quais citocinas secretadas pelos macrófagos poderiam estar interferindo na secreção de citocinas pelas células HTR-8/SVneo, foi avaliado o conteúdo de citocinas no sobrenadante de macrófagos. Nossos dados mostraram que a infecção por *T.*

*gondii* em macrófagos foi capaz de aumentar a secreção de IFN- $\gamma$  e diminuir a secreção de IL-6 e IL-10. Existem alguns fenótipos polarizados de macrófagos, dentre eles: perfil M1 ou macrófagos classicamente ativados que são caracterizados pela secreção de citocinas pró-inflamatórias; e perfil M2 ou macrófagos alternativamente ativados que são produtores de citocinas anti-inflamatórias (Gordon, 2003; Cassetta *et al.*, 2011). Macrófagos M1 são essenciais para a defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, como *T. gondii* (Murray e Wynn, 2011). Por outro lado, estudos demonstraram a coexistência de programas de ativação clássica e alternativa nos macrófagos em resposta a *T. gondii* de diferentes cepas (Patil *et al.*, 2014). Portanto, as diferenças na virulência do parasito, (Liu *et al.*, 2013) assim como o período gestacional marcado pela importante alteração de perfis inflamatórios, podem induzir diferentes polarizações de macrófagos (Nagamatsu e Schust, 2010a) e essas consequências podem influenciar a interação entre células maternas e fetais. Nesse sentido, para avaliar a influência desses macrófagos diferentemente polarizados na produção de citocinas pelas células HTR-8/SVneo, são necessários futuros estudos experimentais.

O balanço entre os processos de proliferação, diferenciação e apoptose de células trofoblásticas representam um mecanismo de controle normal da invasão do trofoblasto (Brosens *et al.*, 1972; Smith *et al.*, 1997; Naicker *et al.*, 2013) e os macrófagos são essenciais nesse processo. Os macrófagos estão envolvidos na eliminação de células apoptóticas, e também estão relacionados à manutenção da homeostase tecidual orquestrando a morte ou a sobrevivência de células vizinhas (Abrahams *et al.*, 2004). Nesse sentido, macrófagos são importantes na modulação da apoptose em células trofoblásticas extravilosas, na regulação da invasão do trofoblasto e também na placentação (Brosens *et al.*, 1972; Smith *et al.*, 1997; Naicker *et al.*, 2013). A apoptose é um dos mecanismos que preservam o número apropriado de células, removendo as células velhas ou não funcionais, permitindo a renovação tecidual (Aschkenazi *et al.*, 2002). Além de ser um mecanismo da imunidade, como defesa do organismo, para eliminação de células infectadas impedindo a disseminação da infecção.

Uma das consequências da ativação desse processo apoptótico é a exposição de fosfatidilserina na monocamada externa da membrana plasmática, caracterizando o PS-flip (Huppertz *et al.*, 2006). No entanto, esse evento pode ser reversível quando ativado (Martin *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 1997), e a cascata apoptótica pode ser evitada ou interrompida prevenindo a morte celular, principalmente quando há influência de alguns fatores, como *T. gondii*. Isso pode ser observado em nossos resultados, uma vez que observamos altos níveis de expressão de fosfatidilserina na monocamada externa da membrana de células HTR-8/SVneo em todas as condições experimentais, mas menores índices apoptóticos. Células

HTR-8/SVneo não infectadas e estimuladas com meio condicionado de macrófagos, independentemente da infecção por *T. gondii*, demonstraram maiores índices apoptóticos quando comparado com células HTR-8/SVneo não tratadas e não infectadas. Esse evento sugere que os macrófagos podem ser indutores de apoptose dessas células trofoblásticas no sentido de induzir um normal, equilibrado e eficiente processo de invasão pelo trofoblasto extraviloso (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005), mesmo na presença de agentes infecciosos, como *T. gondii*.

Diante da infecção de células HTR-8/SVneo por *Toxoplasma*, foi verificado também altos níveis de células produtoras das citocinas anti-apoptóticas MIF, TGF- $\beta$ 1 e IL-6 e reduzidos índices de apoptose, como já também observado por outros autores em diferentes modelos experimentais (Aschkenazi *et al.*, 2002; Naugler e Karin, 2008; Tu *et al.*, 2012; Angeloni *et al.*, 2013; Bevilacqua *et al.*, 2014). No entanto, um aumento da expressão de fosfatidilserina no lado externo da membrana foi detectado. Alguns estudos mostraram que *T. gondii* pode evadir dos mecanismos efetores antiparasitários da célula hospedeira no sentido de manter sua própria sobrevivência e reprodução (Hippe *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2012). Adicionalmente, essa estratégia pode estar associada à manipulação pelo parasito das vias intracelulares de sinalização da célula hospedeira (Song *et al.*, 2012; Angeloni *et al.*, 2013). Desse modo, um recente estudo encontrou que a fosforilação de STAT3 é regulada positivamente pela infecção por *T. gondii* em macrófagos humanos (Cai *et al.*, 2014). Trabalhos prévios do nosso grupo também demonstraram um aumento da fosforilação de ERK1/2 em células trofoblásticas humanas infectadas por *T. gondii* e esse dado esteve associado com baixos índices de apoptose nestas células na presença da infecção (Angeloni *et al.*, 2013). Nesse sentido, *T. gondii* pode regular negativamente a apoptose em células trofoblásticas humanas pela ativação de vias intracelulares de sinalização, contudo futuros experimentos são necessários para verificar essa hipótese em células trofoblásticas humanas extravilosas. Assim, é possível concluir que *T. gondii* pode interferir nos estágios iniciais de apoptose em células HTR-8/SVneo, modulando negativamente ou revertendo o processo de morte celular.

Células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* e tratadas com meio condicionado de macrófagos não infectados tiveram os índices de apoptose restaurados, similar à condição sem infecção. Diferentemente, foi mostrado que células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas com meio condicionado de macrófagos infectados tiveram uma regulação negativa do índice de apoptose, semelhante à condição das células HTR-8/SVneo não tratadas, mas infectadas. Esse fato parece estar relacionado com a secreção de citocinas pelas células HTR-8/SVneo tratadas

com o sobrenadante de macrófagos e infectadas, uma vez que elas são capazes de inibir a morte celular (Aschkenazi *et al.*, 2002; Naugler e Karin, 2008; Seavey e Mosmann, 2008; Angeloni *et al.*, 2013; Bevilacqua *et al.*, 2014); entretanto, outros mediadores podem estar envolvidos nesse processo. O tratamento com meio condicionado de macrófagos não infectados contém outros fatores que diferentemente estimulam as células HTR-8/SVneo quando comparadas às mesmas células tratadas com o sobrenadante de macrófagos infectados. Provavelmente, a liberação de FasL solúvel e a expressão do receptor de morte podem estar relacionados com esses dados, uma vez que a ativação da via apoptótica será desencadeada de acordo com a disponibilidade de FasL o qual será reconhecido pelo receptor.

O sistema Fas/FasL representa um dos importantes fatores ativadores da via apoptótica (Nagata, 1994; Hippe *et al.*, 2008). Um possível mecanismo pelo qual macrófagos podem induzir a apoptose em células HTR-8/SVneo é pela liberação de FasL. Macrófagos, assim como células trofoblásticas, possuem um estoque intracelular de FasL que pode ser liberado mediante ativação celular (Mayhew, 2001; Straszewski-Chavez *et al.*, 2005). Isto explicaria os altos níveis de FasL e a maior expressão de Fas/CD95 em células HTR-8/SVneo tratadas com meio condicionado, possivelmente induzidos pelos sobrenadantes de macrófagos. Infecções microbianas também podem promover um sinal de estresse que ativa a via apoptótica (Hippe *et al.*, 2008; Labbe e Saleh, 2008). Assim, os maiores níveis de FasL no sobrenadante de células HTR-8/SVneo e macrófagos pode ser uma tentativa da célula hospedeira em evitar a disseminação da infecção. É necessário considerar também que o aumento da produção de FasL pode ser uma estratégia utilizada pelo parasito para evadir dos mecanismos antiparasitários efetores. Nesse sentido, o parasito pode induzir a liberação de FasL para promover o processo apoptótico de células do sistema imune que são recrutadas para o controle da infecção. Todavia, *T. gondii* também pode modular a morte celular com a regulação negativa da expressão de Fas/CD95 pela célula hospedeira (Vutova *et al.*, 2007). Além disso, as citocinas IL-6, MIF e TGF- $\beta$ 1 também produzidas diante da infecção estão relacionadas com a inibição da apoptose pela diminuição do receptor de morte celular Fas/CD95 de acordo com outros estudos (Aschkenazi *et al.*, 2002; Angeloni *et al.*, 2013).

Diante desses dados, a diferença entre os índices apoptóticos de células HTR-8/SVneo infectadas tratadas com meio condicionado baseado na relação entre a expressão de Fas/CD95 e a liberação de FasL solúvel no sobrenadante de macrófagos podem ser sugeridas. Observamos que os maiores índices apoptóticos de células HTR-8/SVneo infectadas tratadas com meio condicionado não infectado está associado à menor liberação de FasL no sobrenadante de macrófagos e à maior expressão do receptor de morte, possibilitando maiores

chances de ativação da cascata apoptótica. Por outro lado, os menores índices apoptóticos de células HTR-8/SVneo infectadas tratadas com meio condicionado infectado está associado à maior liberação de FasL no sobrenadante de macrófagos e à menor expressão do receptor de morte, sugerindo que a ativação da morte celular, mesmo diante da presença de FasL solúvel é limitada devido à menor expressão do receptor de morte acarretando os menores índices apoptóticos.

Considerando todos os nossos resultados, foi mostrado que a infecção por *T. gondii* de células HTR-8/SVneo foi responsável pelos baixos índices de apoptose nestas células, mesmo na presença do meio condicionado de macrófagos infectados. Entretanto, o meio condicionado de macrófagos não infectados nas células HTR-8/SVneo induziu altos índices de apoptose. Assim, é possível sugerir que o parasito é capaz de reverter os altos índices de apoptose em células HTR-8/SVneo no sentido de favorecer seu estabelecimento na célula hospedeira, e os macrófagos tentam restaurar este fenômeno. Em um sistema *in vivo* estes mecanismos podem estar relacionados com a manutenção da invasão da mucosa uterina por células trofoblásticas extravilosas e estabelecimento de uma placenta funcional. O presente estudo contribuiu para elucidar a interação entre células trofoblásticas extravilosas e macrófagos em um modelo de interface materno fetal, contribuindo para o melhor entendimento das complexas interações celulares operantes na interface materno fetal, mesmo na presença de infecção por *T. gondii*.

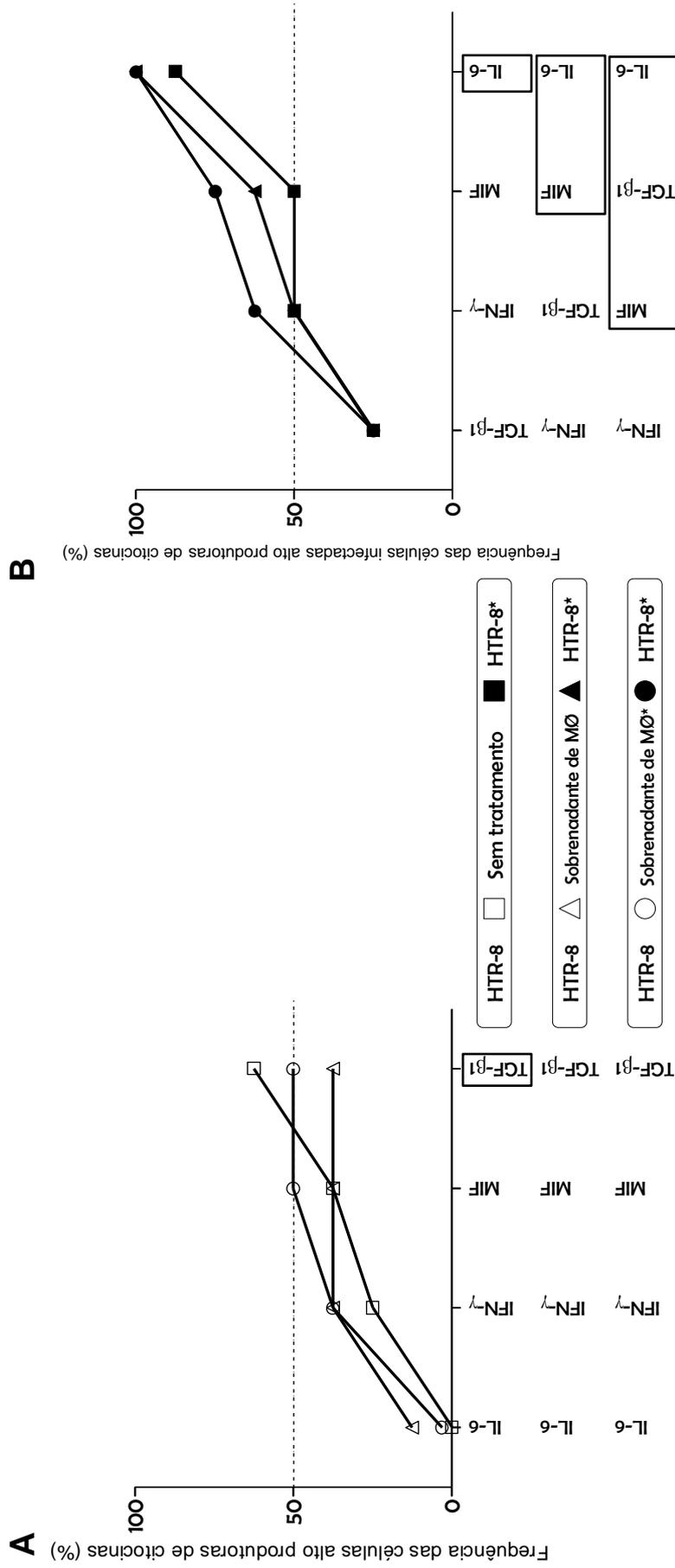
## 6. CONCLUSÕES

Com base nos nossos resultados podemos concluir que:

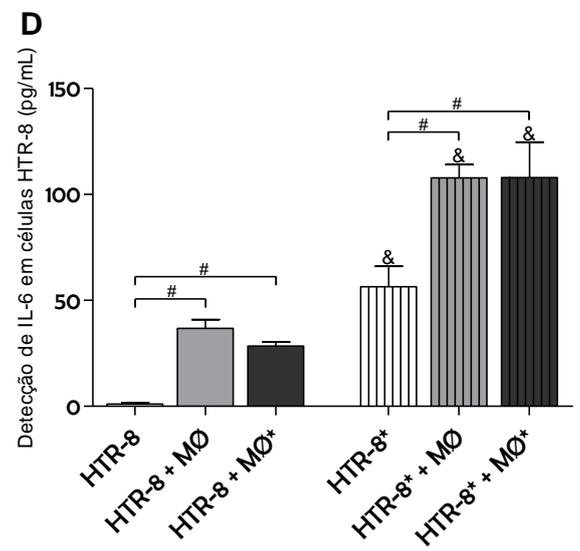
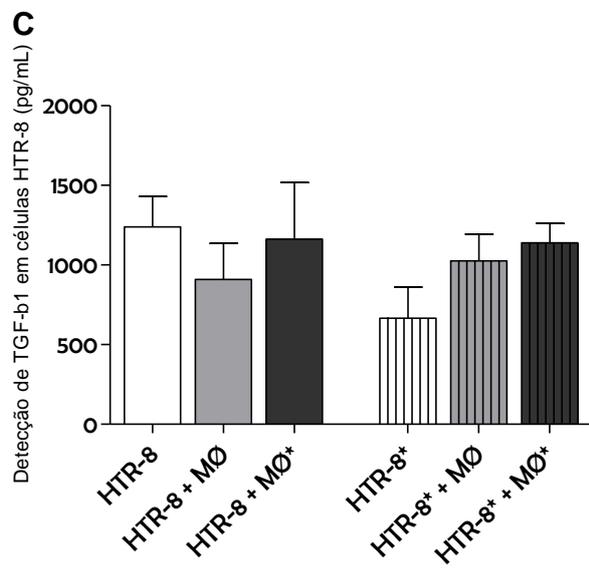
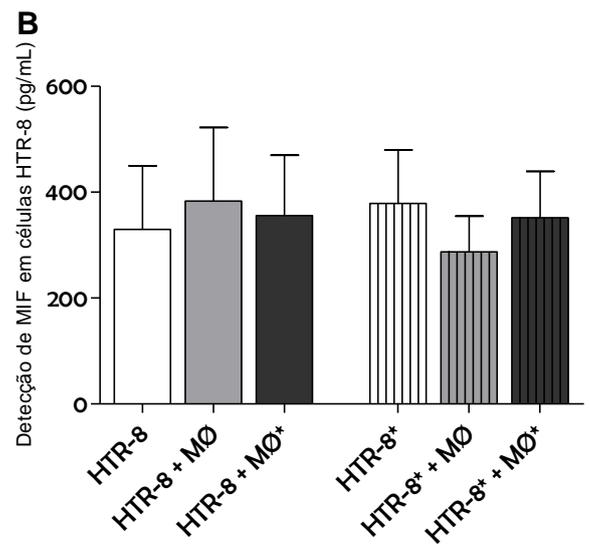
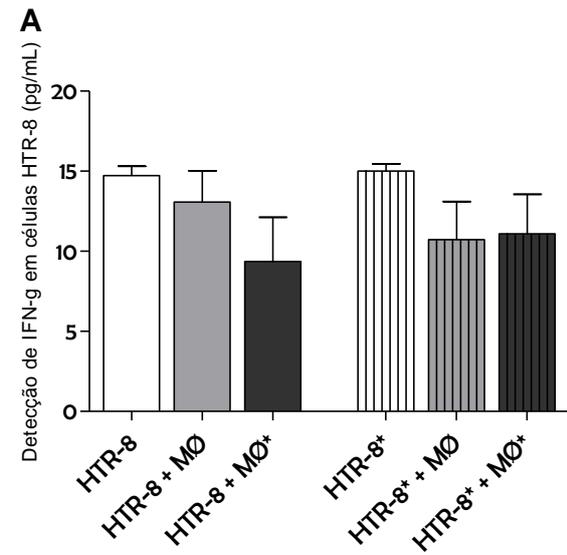
- Estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por *T. gondii* aumentam a população de células HTR-8/SVneo alto produtoras de IL-6, MIF e TGF- $\beta$ 1.
- Estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por *T. gondii* aumentam sinergicamente a secreção de IL-6 por células HTR-8/SVneo.
- Infecção de macrófagos por *T. gondii* modula a secreção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10.
- Estímulo com meio condicionado de macrófagos e infecção por *T. gondii* modulam os índices de apoptose em células HTR-8/SVneo.
- Infecção de células HTR-8/SVneo por *T. gondii* diminui a expressão de Fas/CD95.
- Infecção de macrófagos e células HTR-8/SVneo induzem a liberação de FasL solúvel.
- Estímulo com meio condicionado de macrófagos não altera a proliferação de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo.

**7. FIGURAS**

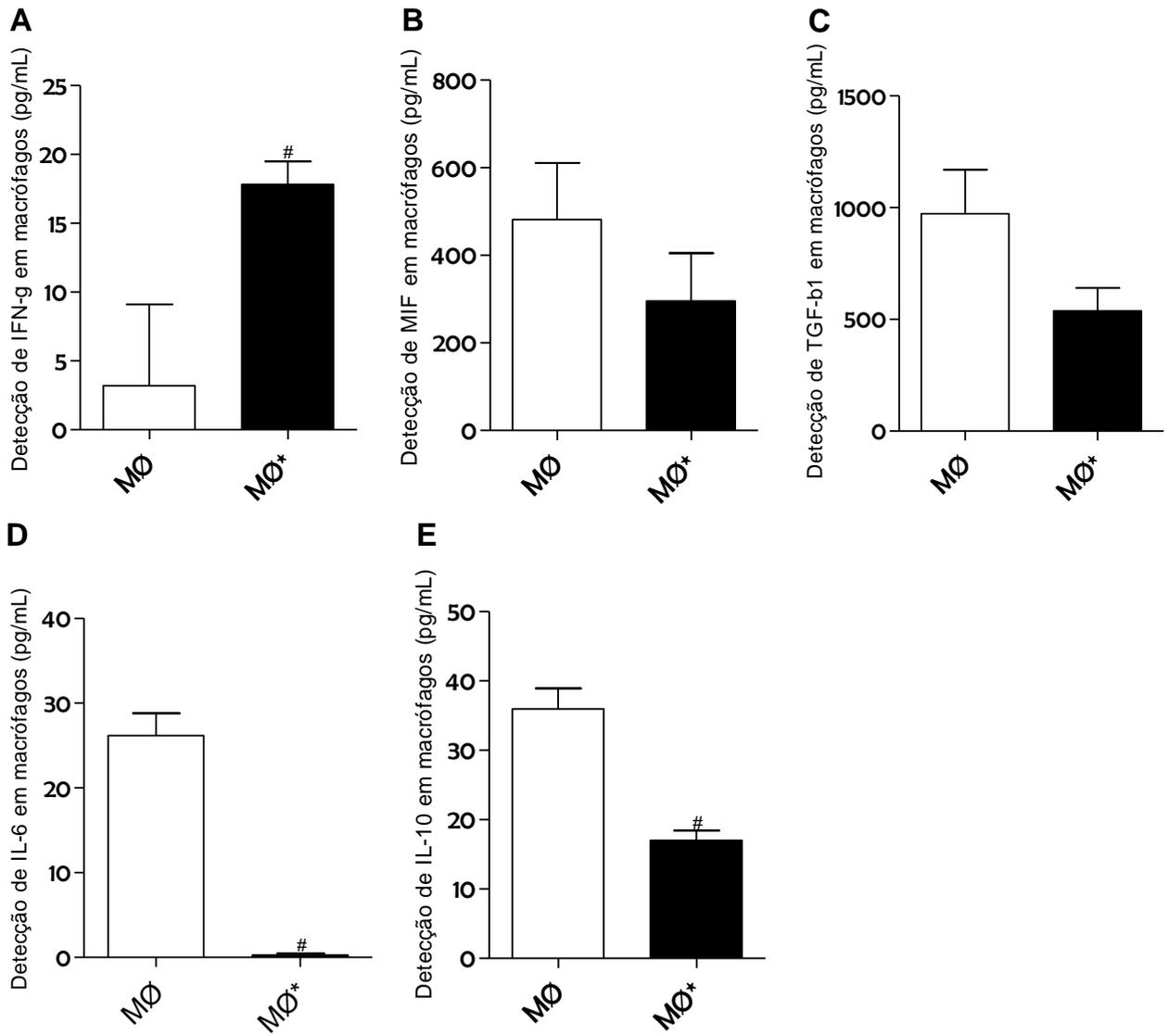
**Figura 1.** Assinatura de citocinas em células HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo estimuladas ou não com meio condicionado de macrófagos, na ausência (A) ou presença (B) de infecção por *T. gondii*. Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes das células HTR-8/SVneo foram coletados e analisados para a produção de citocinas por ELISA. Os resultados foram expressos como frequência dos altos níveis de citocinas (%) calculados a partir da mediana global de cada citocina. As frequências foram consideradas relevantes quando acima de 50%. Os retângulos indicam as citocinas que estão acima de 50% em cada condição experimental. (\*) Representa a infecção por *T. gondii*.



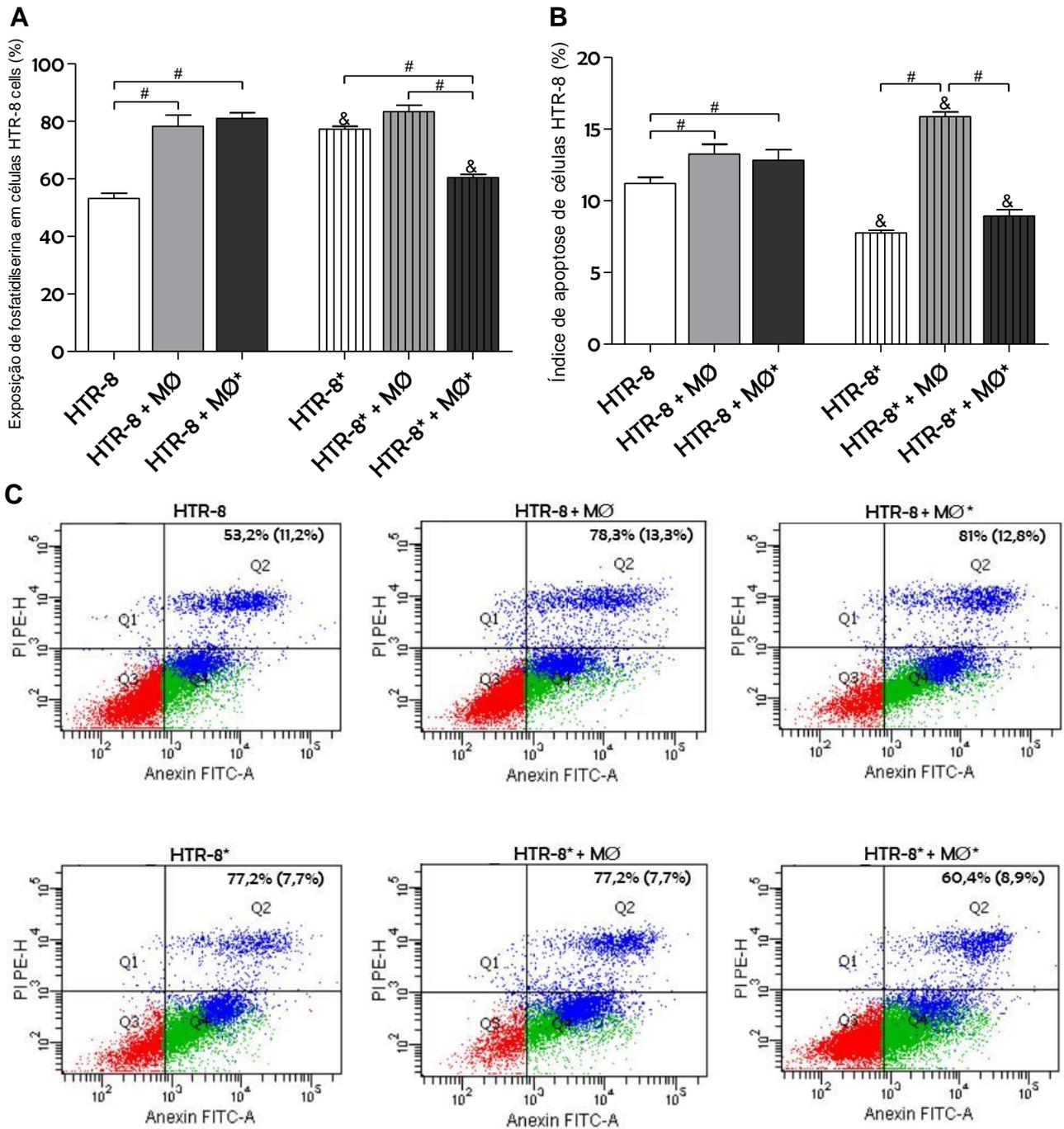
**Figura 2.** Secreção de citocinas pelas células HTR-8/SVneo tratadas ou não com meio condicionado de macrófagos e posteriormente infectadas ou não por *T. gondii*. As citocinas IFN- $\gamma$  (**A**), MIF (**B**), TGF- $\beta$ 1 (**C**) e IL-6 (**D**) foram mensuradas por ELISA e os resultados foram expressos em pg/mL. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. (#) Comparação entre condições experimentais diferentes no mesmo grupo (grupo 1: células HTR-8/SVneo não infectadas ou grupo 2: células HTR-8/SVneo infectadas) ( $p < 0,05$ ). (&) Comparação com o grupo de células HTR-8/SVneo não infectadas ( $p < 0,05$ ). (\*) Representa a infecção por *T. gondii*.



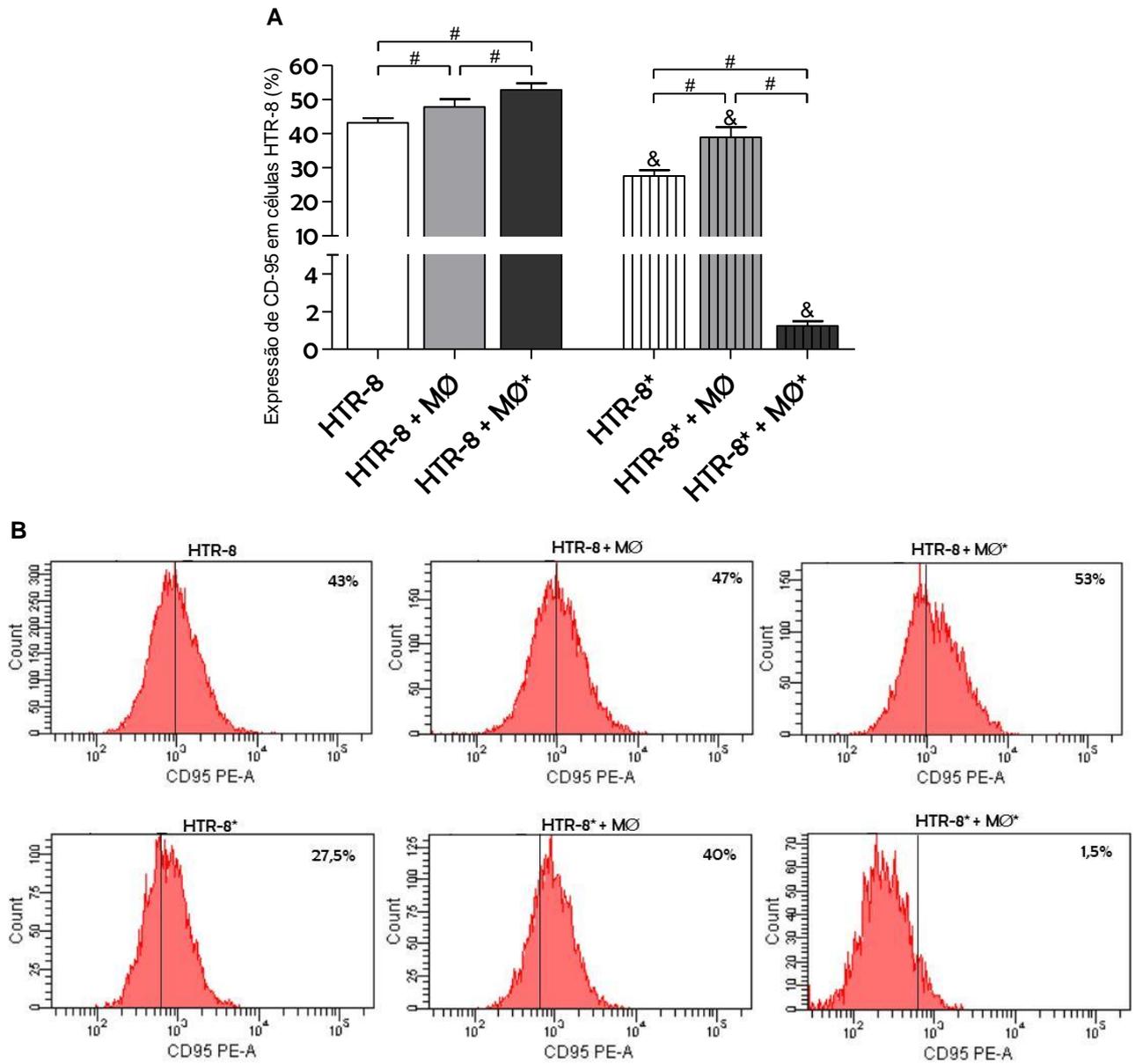
**Figura 3.** Secreção de citocinas por macrófagos infectados ou não por *T. gondii*. As citocinas IFN- $\gamma$  (A), MIF (B), TGF- $\beta$ 1 (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) foram mensuradas por ELISA e os resultados foram expressos em pg/mL. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. (#) Comparação entre macrófagos infectados e não infectados ( $p < 0,05$ ). (\*) Representa a infecção por *T. gondii*.



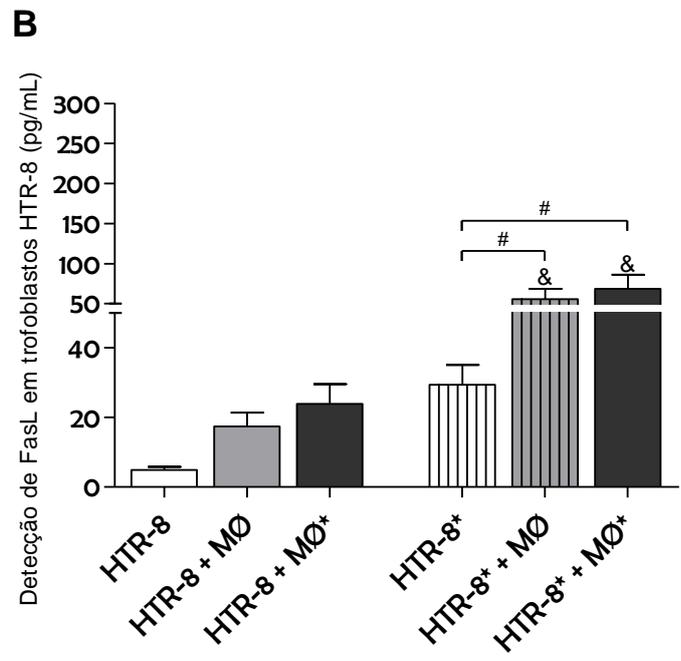
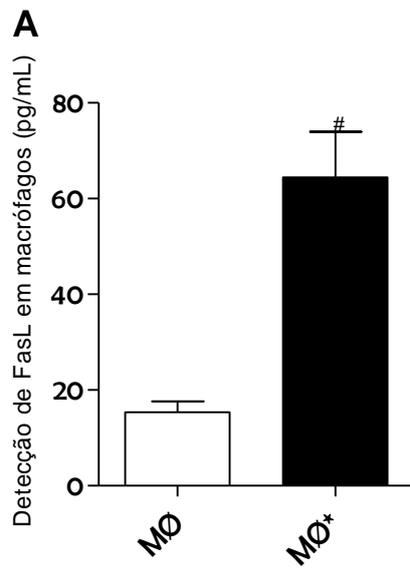
**Figura 4.** Influência do estímulo com sobrenadante de macrófagos em células HTR-8/SVneo posteriormente infectadas ou não por *T. gondii* na exposição de fosfatidilserina (**A**) e nos índices de apoptose (%) (**B**). (**C**) Gráficos em *dot spots* obtidos da análise pela citometria de fluxo representam nos quadrantes: Q1 as células marcadas com iodeto de propídio, Q2 as células duplo-marcadas (valor médio representado dentro dos parênteses), Q4 as células marcadas com anexina (valor médio representado fora dos parênteses). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. (#) Comparação entre condições experimentais diferentes no mesmo grupo (grupo 1: células HTR-8/SVneo não infectadas ou grupo 2: células HTR-8/SVneo infectadas) ( $p < 0,05$ ). (&) Comparação com o grupo de células HTR-8/SVneo não infectadas ( $p < 0,05$ ). (\*) Representa a infecção por *T. gondii*.



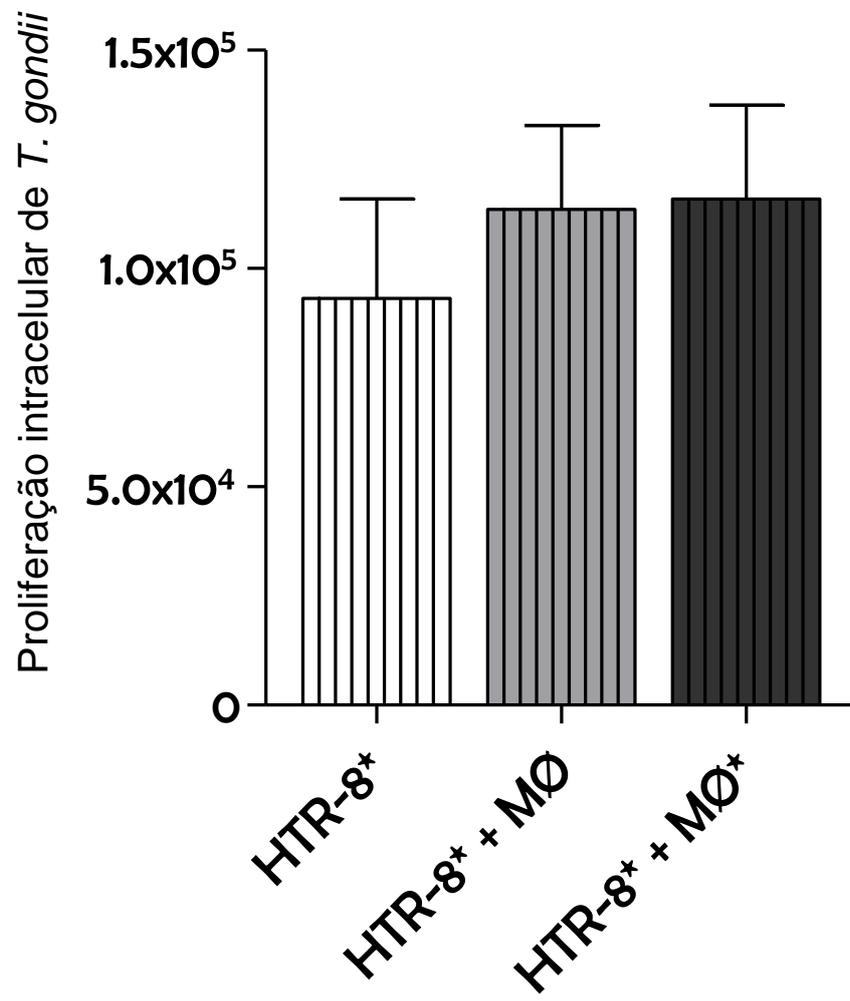
**Figura 5.** Influência do estímulo com sobrenadante de macrófagos em células HTR-8/SVneo posteriormente infectadas ou não por *T. gondii* na expressão de Fas/CD95 (%) (A). (B) Histogramas obtidos da análise pela citometria de fluxo com porcentagem representando o valor médio da expressão de Fas/CD95 (linha preta representando o valor médio da expressão de Fas/CD95 dos controles infectados ou não). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. (#) Comparação entre condições experimentais diferentes no mesmo grupo (grupo 1: células HTR-8/SVneo não infectadas ou grupo 2: células HTR-8/SVneo infectadas) ( $p < 0,05$ ). (&) Comparação com o grupo de células HTR-8/SVneo não infectadas ( $p < 0,05$ ). (\*) Representa a infecção por *T. gondii*.



**Figura 6.** Secreção de FasL solúvel por macrófagos (A) e células HTR-8/SVneo tratadas ou não com meio condicionado e infectadas ou não por *T. gondii* (B). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para os macrófagos: (#) Comparação entre macrófagos infectados e não infectados ( $p < 0,05$ ). Para as células HTR-8/SVneo: (#) Comparação entre condições experimentais diferentes no mesmo grupo (grupo 1: células HTR-8/SVneo não infectadas ou grupo 2: células HTR-8/SVneo infectadas) ( $p < 0,05$ ). (&) Comparação com o grupo de células HTR-8/SVneo não infectadas ( $p < 0,05$ ). (\*) Representa a infecção por *T. gondii*.



**Figura 7.** Proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo após o tratamento com meio condicionado de macrófagos infectados ou não por *T. gondii*. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. 566.

ABOU-BACAR, A. et al. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1397-401, Mar 2004.

ABRAHAMS, V. M. et al. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 51, n. 4, p. 275-82, Apr 2004.

ABUMAREE, M. H. et al. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? **J Reprod Immunol**, v. 94, n. 2, p. 131-41, Jun 2012.

ANGELONI, M. B. et al. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 973-82, Nov 2013.

ANGELONI, M. B. et al. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, v. 30, n. 9, p. 785-91, Sep 2009.

ASCHKENAZI, S. et al. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. **Biol Reprod**, v. 66, n. 6, p. 1853-61, Jun 2002.

BARBOSA, B. F. et al. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-62, Mar 2014.

BARBOSA, B. F. et al. 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. 536-45, Mar 2008.

BEVILACQUA, E. et al. Review: putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. **Placenta**, v. 35 Suppl, p. S51-6, Feb 2014.

BLANCO-LAGO, R. et al. [Congenital toxoplasmosis and cortical development malformation: an infrequent association]. **Rev Neurol**, v. 50, n. 4, p. 253-4, Feb 16-28 2010.

BODAGHI, B. et al. Toxoplasmosis: new challenges for an old disease. **Eye (Lond)**, v. 26, n. 2, p. 241-4, Feb 2012.

BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 935-46, Jul 1 2009.

BOYLE, J. P.; RADKE, J. R. A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 903-14, Jul 1 2009.

BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 582-7, Dec 2007.

BROSENS, I. A.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet Gynecol Annu**, v. 1, p. 177-91, 1972.

CAI, Y. et al. Toxoplasma gondii inhibits apoptosis via a novel STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. **Cell Signal**, v. 26, n. 6, p. 1204-12, Jun 2014.

CARELLOS, E. V. et al. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88588, 2014.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 83-9, Feb 2007.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen Toxoplasma gondii. **Acta Trop**, v. 81, n. 2, p. 111-22, Feb 2002.

CARRUTHERS, V. B. Proteolysis and Toxoplasma invasion. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 5, p. 595-600, May 1 2006.

CARVALHO, J. V. et al. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to Neospora caninum infection. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 14, p. 1629-37, Dec 2010.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2391-402, 2011.

CASTRO, A. S. et al. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control Toxoplasma gondii infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240-7, Mar 2013.

CHAMPION, H. et al. Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. **Mol Hum Reprod**, v. 18, n. 8, p. 391-400, Aug 2012.

CHAOUAT, G. et al. Tolerance to the foetal allograft? **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 624-36, Jun 2010.

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

CHEN, S. J.; LIU, Y. L.; SYTWU, H. K. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 258391, 2012.

COMBE, C. L. et al. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 4913-21, Aug 2005.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res**, v. 105, n. 4, p. 893-8, Oct 2009.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. **Apoptosis**, v. 12, n. 4, p. 781-90, Apr 2007.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec 9 2004.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **J Eukaryot Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 467-75, Nov-Dec 2008.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 267-99, Apr 1998.

DUBINSKY, V. et al. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 3, p. 193-9, Mar 1 2010.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 793-813, Nov 2012.

EATON, M. S.; WEISS, L. M.; KIM, K. Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 1, p. 107-14, Jan 2006.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 1, p. 58-85, Jan 2013.

FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 5, p. 330-49, May 2012.

FEST, S. et al. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 57, n. 1, p. 55-66, Jan 2007.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FITZGERALD, J. S. et al. Signal transduction in trophoblast invasion. **Chem Immunol Allergy**, v. 88, p. 181-99, 2005.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003.

GRAHAM, C. H. et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. **Exp Cell Res**, v. 206, n. 2, p. 204-11, Jun 1993.

GUBBELS, M. J.; DURAISINGH, M. T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 12, p. 1071-81, Nov 2012.

GUDE, N. M. et al. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb Res**, v. 114, n. 5-6, p. 397-407, 2004.

GYRD-HANSEN, M.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 561-74, Aug 2010.

HAPPO, L.; STRASSER, A.; CORY, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 5, p. 1081-7, Mar 1 2012.

HIPPE, D. et al. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 2905-12, Jul 2008.

HIPPE, D. et al. *Toxoplasma gondii* infection confers resistance against BimS-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 19, p. 3511-21, Oct 1 2009.

HU, K. et al. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 2, p. e13, Feb 2006.

HUNT, J. S. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. **J Reprod Immunol**, v. 16, n. 1, p. 1-17, Sep 1989.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 766-78, Nov 2012.

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

IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Starvation of low-density lipoprotein-derived cholesterol induces bradyzoite conversion in *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 1, p. 248, 2014.

JONGERT, E. et al. Functional characterization of in vivo effector CD4(+) and CD8(+) T cell responses in acute Toxoplasmosis: an interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells. **Vaccine**, v. 28, n. 13, p. 2556-64, Mar 16 2010.

JOVANOVIC, M.; VICOVAC, L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. **Placenta**, v. 30, n. 4, p. 320-8, Apr 2009.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biol Reprod**, v. 69, n. 1, p. 1-7, Jul 2003.

KAWAZOE, U. **Kawazoe U**. 11. São Paulo: Atheneu, 2005.

KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **J Fr Ophtalmol**, v. 33, n. 5, p. 362-7, May 2010.

KORNER, H. et al. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers.

**Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 879-88, Jul 2010.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am J Med**, v. 118, n. 3,

p. 212-6, Mar 2005.

LABBE, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell Death Differ**, v.

15, n. 9, p. 1339-49, Sep 2008.

LAMBERT, H.; DELLACASA-LINDBERG, I.; BARRAGAN, A. Migratory responses of

leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect**, v. 13, n. 1, p. 96-102, Jan 2011.

LANG, C.; GROSS, U.; LUDER, C. G. Subversion of innate and adaptive immune responses

by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**, v. 100, n. 2, p. 191-203, Jan 2007.

LEVY, R.; NELSON, D. M. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human

trophoblast. **Placenta**, v. 21, n. 1, p. 1-13, Jan 2000.

LI, C. F. et al. Reduced expression of survivin, the inhibitor of apoptosis protein correlates

with severity of preeclampsia. **Placenta**, v. 33, n. 1, p. 47-51, Jan 2012.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital

toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1829-31, Dec 2011.

LIU, T. et al. Trophoblast apoptosis through polarization of macrophages induced by Chinese

*Toxoplasma gondii* isolates with different virulence in pregnant mice. **Parasitol Res**, v. 112,

n. 8, p. 3019-27, Aug 2013.

LUDER, C. G.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 289, p. 219-37, 2005.

LUDER, C. G. et al. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 2, p. 163-73, Jan 2009.

MARTIN, S. J. et al. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. **J Biol Chem**, v. 271, n. 46, p. 28753-6, Nov 15 1996.

MAUBON, D. et al. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 299-303, Jul 2008.

MAYHEW, T. M. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. **Histol Histopathol**, v. 16, n. 4, p. 1213-24, Oct 2001.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 11, p. 487-95, Nov 2011.

MOLESTINA, R. E. et al. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 21, p. 4359-71, Nov 1 2003.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, Jun 12 2004.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723-37, Nov 2011.

NAGAMATSU, T.; SCHUST, D. J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 460-71, Jun 2010a.

NAGAMATSU, T.; SCHUST, D. J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. **Reprod Sci**, v. 17, n. 3, p. 209-18, Mar 2010b.

NAGATA, S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. **Adv Immunol**, v. 57, p. 129-44, 1994.

NAICKER, T. et al. The role of apoptosis on trophoblast cell invasion in the placental bed of normotensive and preeclamptic pregnancies. **Hypertens Pregnancy**, v. 32, n. 3, p. 245-56, Aug 2013.

NAITO, M. et al. Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2060-6, Mar 15 1997.

NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 3, p. 109-19, Mar 2008.

OLIVEIRA, J. G. et al. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 691-8, Jun-Jul 2006.

PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflamm Res**, v. 56, n. 1, p. 45-50, Jan 2007.

PATIL, V. et al. Co-existence of classical and alternative activation programs in macrophages responding to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 44, n. 2, p. 161-4, Feb 2014.

PENG, H. J.; CHEN, X. G.; LINDSAY, D. S. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **J Parasitol**, v. 97, n. 4, p. 620-8, Aug 2011.

PETSAS, G. et al. Aberrant expression of corticotropin-releasing hormone in pre-eclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis. **Mol Hum Reprod**, v. 18, n. 11, p. 535-45, Nov 2012.

REMINGTON, J. S. et al. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. In: (Ed.). **Toxoplasmosis**. 5. Philadelphia: WB, 2001.

REY, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: (Ed.). **Parasitologia**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.321-334.

ROBBEN, P. M. et al. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **J Immunol**, v. 172, n. 6, p. 3686-94, Mar 15 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Apr 2012.

ROBERTSON, S. A. et al. Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3996-4006, Aug 2010.

RODRIGUES, V. et al. Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 325-33, Mar 2012.

SALAMONE, G. et al. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Hum Reprod**, v. 27, n. 9, p. 2598-606, Sep 2012.

SANTOS, T. A. et al. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27867, 2011.

SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J Leukoc Biol**, v. 59, n. 4, p. 555-61, Apr 1996.

SEAVEY, M. M.; MOSMANN, T. R. Immunoregulation of fetal and anti-paternal immune responses. **Immunol Res**, v. 40, n. 2, p. 97-113, 2008.

SEKI, H. et al. TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 33, n. 4, p. 408-16, Aug 2007.

SEPULVEDA-ARIAS, J. C. et al. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Med Infect Dis**, Jun 7 2014.

SHEINER, L. et al. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. **Mol Microbiol**, Jun 9 2010.

SILVA, M. L. et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 583-92, Jan 10 2011.

SINAI, A. P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Subcell Biochem**, v. 47, p. 155-64, 2008.

SINAI, A. P. et al. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 3, p. 381-91, Mar 9 2004.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. Toxoplasma gondii: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol Res**, v. 107, n. 2, p. 253-60, Jul 2010.

SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 177, n. 1, p. 57-65, Jul 1997.

SONG, K. J.; AHN, H. J.; NAM, H. W. Anti-apoptotic effects of SERPIN B3 and B4 via STAT6 activation in macrophages after infection with Toxoplasma gondii. **Korean J Parasitol**, v. 50, n. 1, p. 1-6, Mar 2012.

SOUZA, W.; DUARTE, E. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C.

Organização estrutural do taquizoíto de Toxoplasma gondii. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 3, p. 509-13, Sep 2004.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, Sep 14 2011.

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocr Rev**, v. 26, n. 7, p. 877-97, Dec 2005.

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during Toxoplasma gondii infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 8, p. 3090-7, Aug 2014.

SULLIVAN, W. J., JR.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 717-33, May 2012.

SUMAN, P.; GUPTA, S. K. Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells. **Placenta**, v. 33, n. 10, p. 874-7, Oct 2012.

SYKES, L. et al. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 967629, 2012.

SZEKERES-BARTHO, J. Immunological relationship between the mother and the fetus. **Int Rev Immunol**, v. 21, n. 6, p. 471-95, Nov-Dec 2002.

TANTBIROJN, P.; CRUM, C. P.; PARAST, M. M. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 639-45, Jul 2008.

TEO, C. F. et al. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 679-88, Feb 2007.

TSUCHIYA, S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int J Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-6, Aug 1980.

TU, B. et al. STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. **Cancer Lett**, v. 325, n. 1, p. 80-8, Dec 1 2012.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; DE LEON-NAVA, M. A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 114-21, 2009.

VILLE, Y.; LERUEZ-VILLE, M. Managing infections in pregnancy. **Curr Opin Infect Dis**, v. 27, n. 3, p. 251-7, Jun 2014.

VUTOVA, P. et al. Toxoplasma gondii inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 1556-70, Jun 2007.

WHITE, M. W.; RADKE, J. R.; RADKE, J. B. Toxoplasma development - turn the switch on or off? **Cell Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 466-72, Apr 2014.

WHITLEY, G. S. et al. Increased apoptosis in first trimester extravillous trophoblasts from pregnancies at higher risk of developing preeclampsia. **Am J Pathol**, v. 170, n. 6, p. 1903-9, Jun 2007.

WU, Z. M. et al. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. **Placenta**, v. 33, n. 3, p. 188-94, Mar 2012.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 2, p. 109-21, Feb 2014.

YOSHINAGA, K. Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs). **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 413-24, Jun 2010.