

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estabelecimento de modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da toxoplasmose congênita e análise do papel da autofagia na infecção de trofoblastos por *Toxoplasma gondii*

Jéssica da Silva Souza

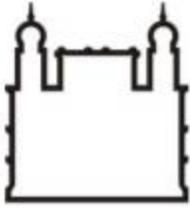
Orientadores:

Dr. Rafael Mariante Meyer

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

RIO DE JANEIRO

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estabelecimento de modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da toxoplasmose congênita e análise do papel da autofagia na infecção de trofoblastos por *Toxoplasma gondii*

Jéssica da Silva Souza

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Dr. Rafael Mariante Meyer
Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

RIO DE JANEIRO

2021

Souza, Jéssica da Silva.

Estabelecimento de modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da toxoplasmose congênita e análise do papel da autofagia na infecção de trofoblastos por *Toxoplasma gondii* / Jéssica da Silva Souza. - Rio de Janeiro, 2021.

102 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

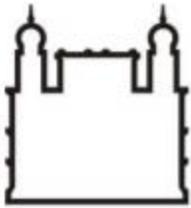
Orientador: Rafael Mariante Meyer.

Co-orientador: Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto.

Bibliografia: f. 94-102

1. *Toxoplasma gondii*. 2. autofagia. 3. toxoplasmose congênita. 4. modelo murino. 5. BeWo. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estabelecimento de modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da toxoplasmose congênita e análise do papel da autofagia na infecção de trofoblastos por *Toxoplasma gondii*

Jéssica da Silva Souza

Orientadores: Dr. Rafael Mariante Meyer

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Examinadores:

Roberta Olmo Pinheiro (IOC/Fiocruz, Presidente da banca)

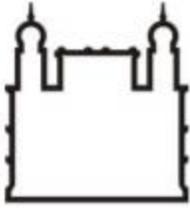
Cherley Borba Vieira de Andrade (UFRJ)

Erica dos Santos Martins Duarte (UFMG)

Suplentes:

Veronica Schmitz Pereira (IOC/Fiocruz, Revisora)

Renato Augusto DaMatta (UENF)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 06 de
setembro de 2021

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estabelecimento de modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da toxoplasmose congênita e análise do papel da autofagia na infecção de trofoblastos por *Toxoplasma gondii*

Jéssica da Silva Souza

O presente trabalho foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

Tenho que iniciar esta seção agradecendo a Deus, pois não vejo a fé como demérito para uma cientista em formação.

Agradeço aos meus pais, Seu Vanderlei e Dona Neném, por sempre terem sido meu porto seguro desde sempre. Nunca teria chegado a lugar algum sem o apoio incondicional, a cobrança diária e o incentivo de vocês. Aproveito para estender o agradecimento aos meus irmãos, Leo e Débora.

Agradeço ao Pedro, meu noivo, futuro marido e melhor amigo pelo apoio incondicional, por ter topado adotar dois gatos, juntar as escovas no meio da pandemia e me incentivar, dia após dia, a continuar estudando sem me desesperar. Também agradeço a meus sogros, Clara e Vile, e minha cunhada, Bianca. Sei que vocês têm orgulho e torcem por mim como ninguém.

Agradeço aos meus orientadores, sem os quais esse trabalho não seria possível: Rubem me ajudou desde a seleção como um verdadeiro treinador, apontando caminhos e sugerindo melhorias com um bom humor inabalável e um vocabulário divertidíssimo. “*Se cair no chão, pasta*”; “*Matar formiga com bazuca*”, entre outras, foram frases que nunca vou me esquecer, Rubem! Obrigada. Sem seus puxões de orelha (quase arrancando a orelha, quase me tornei um van Gogh cientista) eu certamente não teria crescido tanto nesse período! Meu outro orientador, Rafael. Assim como o Rubem, você sempre buscou a excelência no meu trabalho e celebrou cada conceito “A” que eu obtinha. Obrigada por todos os seus *insights* e paciência ao longo desses anos.

Agradeço aos meus filhos de laboratório: Isabela, Larissa e Marcos pela parceria desses anos. Isa correndo de um lado pro outro e fazendo em minutos coisas que eu levaria horas inteiras, me ensinando virtudes acadêmicas e também sendo meu ombro para chorar nos dias difíceis. Lari, sempre com um sensor de problema, nunca consegui enganá-la sobre meu humor, obrigada por alegrar meus dias e ser meu braço direito em

tudo! Marcos, que estava sempre de humor pleno e me arrancava sorrisos até nos dias em que todos os experimentos davam errado. Vocês três me ensinaram a dançar e me divertir bastante, mesmo que tudo estivesse um caos.

Agradeço aos meus amigos de disciplina, de pós e de vida, em especial Rodrigo que fazia as piores piadas nas aulas, procurava gatos no campus comigo e me acompanhou em várias disciplinas; durante a pandemia, também trocamos plasmídeos diversas vezes sobre as aulas on-line e os trabalhos em grupo. Agradeço ao Trevoso – que me chamou para palestrar incontáveis vezes e acreditou no meu trabalho, e ao Lucas – *leishmaniaboy*, conselheiro mais sensato e melhor amigo *ever*. Vocês me ensinaram algumas coisas sobre Naruto, as quais eu já não lembro nenhuma, mas obrigada por terem tentado.

Tenho que agradecer às minhas amigas Catarina, Alexia, Luísa, que também foram meu ombro amigo e ouvido paciente para partilhar tantas vivências dentro do mundo da saúde e da pesquisa!

O próximo agradecimento vai para a *expert* em qualquer setor do laboratório: Sandra Maria! Obrigada por sempre me apoiar, desde a IC! Seja com conversas, seja no trabalho ao me entregar “*parasites*”, por me ensinar a contar células, isolar parasitos, fazer microscopia eletrônica e também por todas as vezes que você me levantou, me incentivou, acreditou em mim quando eu nem acreditava e me tratou como uma verdadeira filha. Você é uma pessoa muito especial para mim!

Agradeço em especial a Helene e Suzana, chefes do LBE, por sempre terem sido gentis comigo. Vocês foram muito pacientes com todas as minhas histórias, eventuais bagunças no almoxarifado e por rirem da maioria das minhas piadas ruins. Também contribuíram, sempre que podiam, com sugestões para o meu trabalho. Agradeço também aos demais pesquisadores, Daniel e Edwards, pelas contribuições intelectuais, risadas e sugestões ao longo dos anos.

Sou grata aos colegas do LBE que na reta final do mestrado foram super solícitos e me ajudaram várias vezes quando precisei, durante a pandemia, sejam trocando meio ou mantendo parasitos, seja com gestos de gentileza.

Agradeço aos colaboradores da biomol: Otacílio, Priscila e Beatriz da plataforma de qPCR! Vocês foram essenciais no ensino da biologia molecular, interpretação de resultados e incrivelmente pacientes quando eu perguntava – SEMPRE – *‘que diacho significa essa curva? Nesse poço aqui entra primer?’*. Esta dissertação está inserida no contexto histórico de uma pandemia: tal qual os colegas do parágrafo acima, Bia e Otacílio me ajudaram DEMAIS durante a pandemia para que meu trabalho pudesse andar respeitando todas as restrições sanitárias, horários, distanciamentos, agendas e afins. Agradeço por todo suporte técnico e, Bia, muito obrigada por ter sido sempre tão legal comigo e sempre arranjar horário pra eu fazer minhas placas *naquela velocidade* de tartaruga que só eu devo ter.

Outra colaboradora essencial para que este trabalho fosse concluído é a Dra. Cherley Borba e a Professora Tânia Ortiga do LET/UFRJ. Ainda na pandemia nos falamos e a Cherley foi o anjo que fez meus tecidos virarem lindas lâminas histológicas. Obrigada pelo suporte técnico e emocional.

Agradeço também aos colaboradores Pedro Manso e Marcelo Pelajo do Laboratório de Patologia do IOC pelo suporte técnico no início do projeto.

Por fim, agradeço à pós-graduação pelo apoio financeiro sempre que precisei, pela estrutura robusta das aulas e avaliações – mesmo em período de pandemia, não me senti desamparada. À Julimar, secretária da pós, que sempre foi muito paciente comigo, respondendo meus e-mails prontamente (*já que não sei falar ao telefone*). Agradeço também a todos os servidores da Fiocruz – bioteristas, porteiros, seguranças e motoristas da Fiocruz! Não teria me sentido segura nos dias e horários mais remotos para estar no campus e nem teria concluído este trabalho sem o apoio destes servidores – ainda mais na pandemia, os servidores responsáveis pela informática que viabilizaram a conclusão de disciplinas e obtenção dos créditos.

“Provavelmente eu não era melhor do que os outros alunos, nem menos desastrada, mas era determinada. Para mim, aprender era algo mágico. Me trazia uma satisfação enorme. (...) Porque havia entendido a simples e instigante correlação entre o tempo que eu praticava e o que conseguia realizar.”

(Michelle Obama, Minha história)

SUMÁRIO

ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	19
<i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose.....	19
1.1. Aspectos gerais	19
1.2. Ciclo e formas de vida	22
1.2.1 Reprodução sexuada.....	22
1.2.2 Reprodução assexuada	24
1.3. Manifestações clínicas e tratamento.....	27
1.3.1 Neurotoxoplasmose e Imunodepressão.....	27
1.3.2 Toxoplasmose congênita	28
2. Modelos animais em toxoplasmose congênita.....	31
2.1 Anatomia da placenta humana e murina	32
2.2 Toxoplasmose congênita em camundongos.....	35
3. Autofagia.....	37
3.1.1 Macroautofagia	43
3.2 Autofagia na infecção	45
3.3 Autofagia na placenta.....	46
II. OBJETIVOS	49
Objetivo geral	49
Objetivos específicos	49
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
1. Experimentação <i>in vitro</i>	50
1.1 Cultura de linhagem de trofoblastos.....	50
1.2 Obtenção de taquizoítos	50
1.3 Infecção da linhagem de trofoblastos	51
b. Índice de infecção	52
1.4 Análise por microscopia de fluorescência	52
1.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	53
2. Experimentação <i>in vivo</i>	54
2.1 Aspectos éticos.....	54
2.2 Estabelecimento do modelo de toxoplasmose congênita.....	54

2.3	Avaliação morfométrica.....	55
2.4	Análises histopatológicas.....	55
3.	Determinação da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR).....	55
3.1	Elaboração da curvas-padrão	55
3.2	Determinação da carga parasitária	56
4.	Análise estatística	57
IV	RESULTADOS	57
4.1	<i>In vitro</i>	57
4.1.1	Determinação do índice de infecção de culturas	57
4.1.2	Rastreamento de autofagia por MDC	58
4.1.3	Análise de autofagia por LC3b.....	60
4.1.4	Avaliação da integridade de barreiras	62
4.1.5	Caracterização ultraestrutural	65
4.2.	<i>In vivo</i>	70
4.2.1	Estabelecimento do modelo murino de toxoplasmose congênita	70
4.2.2	Avaliação morfométrica.....	75
4.2.3	Avaliação histopatológica de placentas.....	78
4.3	Determinação da carga parasitária por qPCR.....	81
4.4	Diagnóstico molecular de tecidos maternos e fetais	84
V.	DISCUSSÃO	86
VI.	CONCLUSÕES.....	93
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMO

A infecção pelo *Toxoplasma gondii* ocorre após ingestão de água ou alimentos contaminados, e embora a maioria dos casos seja assintomática, mulheres grávidas representam um grupo de risco. Na primo-infecção de gestantes, o risco de transmissão congênita é menor no primeiro trimestre, e os danos causados ao embrião são maiores quanto menor o tempo de gestação em que a transmissão acontece. Embora a placenta constitua uma barreira de proteção que previne a transmissão materno-fetal de diversos patógenos, alguns microrganismos, como o *T. gondii*, conseguem atravessá-la. Uma das estratégias empregadas pela placenta para inibir as infecções é a autofagia, via de reciclagem constitutiva de componentes celulares, como macromoléculas e/ou organelas, que pode ser exacerbada em situações de estresse nutricional e infecções. Recentemente demonstrou-se que a infecção de trofoblastos, *in vitro*, por Zika induz autofagia, enquanto o bloqueio *in vivo* da via reduziu esta infecção. A inibição *in vivo* da autofagia em modelo murino restringiu a infecção pelo Zika na placenta e a subsequente transmissão ao embrião. Entretanto, o papel da autofagia na infecção de trofoblastos com *T. gondii* ou na transmissão transplacentária do parasito ainda é desconhecido; existem diversos modelos de toxoplasmose congênita murina, sem nenhum consenso acerca da carga parasitária, cepa ou linhagem de camundongo. Nesta dissertação, estabelecemos dois modelos de infecção: *in vitro*, com a linhagem trofoblasto BeWo usando duas cepas de taquizoítos (ME49 e RH), caracterizando o índice de infecção, detecção de vacúolos autofágicos via fluorescência e análise ultraestrutural, bem como integridade de barreiras celulares; e o segundo modelo com camundongos isogênicos e não-isogênicos após infecção com a cepa ME49. Cinco dias após a infecção, os tecidos maternos e fetais foram coletados e processados para análises morfométricas, histopatológicas e diagnóstico molecular via qPCR para detecção do parasito. Nossos resultados com a linhagem BeWo mostram que a infecção pela cepa ME49 perturba a integridade de barreira placentária e leva ao aumento de autofagossomos. Com a cepa RH, a infecção por *T. gondii* parece induzir autofagia e mitofagia em trofoblastos. Nosso modelo murino de toxoplasmose congênita em linhagem não-isogênica reproduziu aspectos centrais da patologia em humanos, tais quais: macro- e microcefalia, danos à arquitetura placentária, presença de carga parasitária em tecidos maternos e fetais e esplenomegalia. A infecção leva a alterações histológicas da placenta e alta carga parasitária neste tecido, ao passo que as cabeças fetais tendem a ser menos infectadas. Juntos, estes resultados sugerem que a autofagia de trofoblastos pode ser modulada pela infecção por *T. gondii* e nossas perspectivas incluem a modulação farmacológica da autofagia *in vitro* e *in vivo* para melhor investigar o papel da autofagia no desfecho da doença.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii infection occurs after ingestion of contaminated water or food and although most cases are asymptomatic, pregnant women represent a risk group. In the first infection of pregnant women, the risk of congenital transmission is lower in the first trimester, and the damage caused to the embryo is greater the shorter the gestation period in which the transmission takes place. Although the placenta constitutes a protective barrier that prevents mother-to-child transmission of several pathogens, some microorganisms, such as *T. gondii*, can cross it. One of the strategies employed by placenta to inhibit such infection is autophagy, a constitutive recycling pathway of cellular components, such as macromolecules and/or organelles, which can be exacerbated in situations of nutritional stress and diseases. It should also be noted that *in vitro* infection of trophoblasts by Zika induces autophagy, while *in vivo* blockade of the pathway reduced this infection. *In vivo* inhibition of autophagy in a murine model restricted Zika infection in the placenta and subsequent transmission to the embryo. However, the role of autophagy in the infection of trophoblasts with *T. gondii* or in the transplacental transmission of the parasite is still unknown; there are several models of murine congenital toxoplasmosis, without any consensus about the parasite load and strain or mouse model. To understand the role of autophagy in this disease, we established two infection models: *in vitro*, with the trophoblast lineage BeWo using two tachyzoite strains (ME49 and RH), characterizing the infection rate, detection of autophagic vacuoles via fluorescence and ultrastructural analysis, as well cell barrier integrity assessment; the second model consisted in isogenic and non-isogenic mice infection with the ME49 strain. Five days after infection, maternal and fetal tissues were collected, photographed, processed for morphometric and histopathological analysis and molecular diagnosis via qPCR for detection of the parasite. Our results with the BeWo strain show that infection by the ME49 strain disturbs the integrity of the placental barrier and leads to an increase in autophagosomes. With the RH strain, *T. gondii* infection seems to induce autophagy and mitophagy in trophoblasts. Our murine model of congenital toxoplasmosis in a non-isogenic lineage recapitulated central aspects of the pathology in humans, such as: macro- and microcephaly, damage to the placental architecture, parasite load in maternal and fetal tissues and splenomegaly. Infection leads to histological changes in the placenta and a high parasite load in this tissue, whereas fetal heads tend to be less infected. Together, these results suggest that trophoblast autophagy can be modulated by *T. gondii* infection, and our perspectives include pharmacological modulation of autophagy *in vitro* and *in vivo* to further investigate the role of autophagy in disease outcome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Porcentagem da soroprevalência de toxoplasmose no mundo	20
Figura 1.2.	Ciclo sexuado no hospedeiro definitivo	23
Figura 1.3.	Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> .	26
Figura 1.4.	Toxoplasmose congênita em mulheres	29
Figura 1.5.	Diferenças entre as placentas humanas e murinas	34
Figura 1.6.	Tipos de autofagia	41
Figura 1.7.	Macroautofagia em células de mamíferos	42
Figura 4.1.	Caracterização da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em culturas de trofoblastos da linhagem BeWo	58
Figura 4.2.	Rastreamento de autofagossomos com MDC	59
Figura 4.3.	Avaliação qualitativa da autofagia por LC3b	61
Figura 4.3.1.	Detalhe da imunomarcação contra LC3B em culturas infectadas	62
Figura 4.4.	Integridade de barreira placentária.	63
Figura 4.4.1.	Detalhe da análise de integridade de barreira placentária	64
Figura 4.5.	Caracterização ultraestrutural de BeWo não infectada	65
Figura 4.6.	Caracterização ultraestrutural de BeWo infectada por <i>T. gondii</i>	66
Figura 4.7.	Deteção de estruturas sugestivas de autofagia	67
Figura 4.8.	Indícios de mitofagia nas culturas	69
Figura 4.9.	Aspectos macroscópicos de úteros de fêmeas das linhagens BALB/c e Swiss Webster	73
Figura 4.10.	Varição de peso de fêmeas.	74
Figura 4.11.	Peso e área dos baços de fêmeas	75
Figura 4.12.	Área dos fetos e placentas de animais Swiss Webster	77
Figura 4.13	Área dos fetos e placentas de animais BALB/c	78
Figura 4.14	Avaliação histopatológica de placentas de BALB/c	80

- Figura 4.15 Padronização da reação de qPCR para diagnóstico molecular de *T. gondii* em tecidos 84
- Figura 4.16 Cargas parasitárias dos tecidos maternos (baço e placenta) e fetais (cabeças) da linhagem Swiss Webster 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alvos contemplados neste estudo e suas sequências de <i>primers</i> .	56
Tabela 2.	Parâmetros avaliados no modelo murino de toxoplasmose congênita.	71
Tabela 3.	Parâmetros de linearidade de amplificação de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos de camundongos.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS:	síndrome da imunodeficiência adquirida
Akt:	serina-treonina quinase A
AMC:	autofagia mediada por chaperona
ATG:	genes relacionados a autofagia
BSA:	albumina sérica bovina
Ct:	ciclo de limiar, do inglês “ <i>threshold cycle</i> ”
CTG:	células trofoblásticas gigantes
DABCO:	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DMEM:	meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA:	ácido desoxirribonucleico
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético
Ept:	espongiotrofoblastos
GABARAP:	proteína associada ao receptor gama-aminobutírico
HIV:	vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ :	interferon gama
Ig:	imunoglobulina
LAMP-2A:	proteína de associação à membrana lisossomal 2A
LC3:	proteína de cadeia leve 3
MDC:	monodansilcadaverina
MOI:	razão da infecção, do inglês “multiplicity of infection”
mTORc1:	proteína mecanística alvo da rapamicina complexo 1
P13P:	fosfatidilinositol-3-fosfato
PBS:	tampão fosfatosalino
PI3K:	fosfatidilinositol-4,5 bifosfato-3 quinase
qPCR:	reação de cadeia da polimerase quantitativa
SAG-2	antígeno de superfície polimórfico 2

SIN:	sinciciotrofoblastos
SQSTM:	sequestrossomo 1
TEV:	trofoblastos extravilosos
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR:	receptores do tipo “toll”
Tm:	temperatura de anelamento, do inglês “ <i>melting temperature</i> ”
TMN:	trofoblastos mononucleares
TMS:	trofoblastos mononucleares subsinciciais
TNF- α :	fator de necrose tumoral alfa
ULK-1:	quinase Unc-símile, do inglês “ <i>Unc-like kinase</i> ”
Vps34:	proteína de endereçamento vacuolar 34, do inglês “ <i>vacuolar protein sorting</i> ”
ZO-1:	proteína de zona de oclusão 1

I. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii e Toxoplasmose

1.1. Aspectos gerais

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, observado pela primeira vez há mais de um século pelos franceses Charles Nicolle e Louis Manceaux. À época, o parasito foi encontrado em análises histológicas de um roedor (*Ctenodactylus gundi*) utilizado para estudos em leishmaniose. Por esse motivo, os autores acreditavam se tratar de uma espécie do gênero *Leishmania* até perceberem que era um novo organismo, o qual foi batizado a partir de suas características fenotípicas: *toxoplasma* significa arco; *plasma*, vida. A espécie *T. gondii*, como conhecemos hoje, foi fruto de um erro de grafia: o correto seria *gundi*, como o nome da espécie de roedor onde o parasito foi encontrado (1). No mesmo ano, aqui no Brasil, o italiano Alfonso Splendore isolou o parasito a partir de análises histológicas em coelhos (2).

Este protozoário tem distribuição global e estima-se que um terço da população mundial se encontra cronicamente infectada (Figura 1.1)(3).

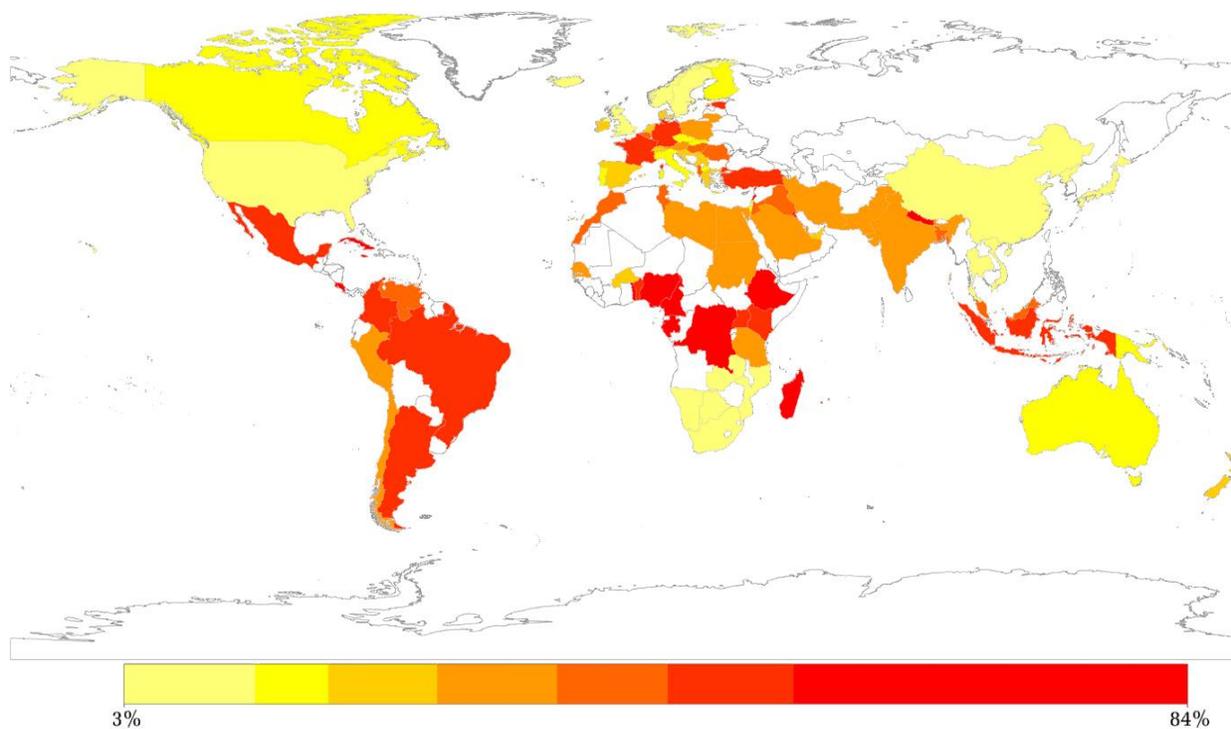


Figura 1.1. Soroprevalência de toxoplasmose no mundo. Os dados foram levantados por Flegr em 2014. O diagnóstico sorológico da toxoplasmose se dá pela quantificação dos níveis de IgG ou IgM no sangue. Os países em branco não possuem informação epidemiológica disponível. Detalhe para alta soroprevalência na América do Sul, na África, e em países europeus, como a França, onde há um alto consumo de alimentos crus que podem ser contaminados com oocistos. Adaptado de (4) .

A soroprevalência da infecção pelo *T. gondii* no Brasil é de 50 a 80% da população adulta (5), enquanto nos Estados Unidos é estimado que 11% da população com mais de 6 anos de idade tenha sido infectada pelo parasito (6). Um estudo na região Norte do Rio de Janeiro detectou que o aumento da ingestão de água não filtrada aumentou o risco de soropositividade para o parasito, o que tinha relação direta com o perfil socioeconômico da população (7). Em contrapartida, o aumento de soropositividade na França, por exemplo, estava diretamente ligado ao hábito de se alimentar de comidas cruas – sobretudo ostras, que podem atuar como carreadores de oocistos (8).

Em 2019, a cidade de São Paulo registrou 45 casos de toxoplasmose nos quais a transmissão do parasito ocorreu a partir da ingestão de alimentos contaminados (9).

Estes alimentos pertenciam a buffets e restaurantes em diversos bairros da cidade; e dentre o total de infectados, pelo menos 16 pessoas ficaram internadas com complicações. Um ano antes deste surto em São Paulo, a cidade de Santa Maria (RS) também foi acometida por um grave surto de toxoplasmose. Neste, foram confirmados 809 casos, sendo 114 gestantes. Foram reportados 10 casos de abortos, 3 mortes fetais e 22 casos de toxoplasmose congênita (10). Após este surto, a cidade reforçou a vigilância epidemiológica para monitorar focos de contaminação pelo parasito.

Quanto à diversidade genotípica, o *T. gondii* possui centenas de genótipos distintos (11), que podem ser organizados em seis clados. Os mais estudados e melhor caracterizados são os tipos I, II e III, que correspondem à análise genética do locus do antígeno de superfície polimórfico 2 (SAG2). No entanto, na América do Sul e Central observou-se a maior diversidade genética do parasito, com alta prevalência de cepas atípicas – isto é, que não se encaixam nestes três genótipos supracitados (11). Em um estudo conduzido no Brasil, viu-se que todas as cepas isoladas tinham genótipos recombinantes (12). A estes genótipos atípicos, foram atribuídos casos de toxoplasmose sistêmica em indivíduos imunocompetentes – mostrando uma possível associação entre estes e a patogenicidade em humanos (13,14).

Inicialmente, os genótipos I, II e III foram segregados por diferenças na virulência em camundongos. Apesar de terem uma semelhança genética de mais de 98%, apresentam diferenças fenotípicas quanto a virulência, persistência, capacidade migratória e indução de expressão de citocinas nestes animais (15). A partir do isolamento de cepas destes biomodelos e também de culturas *in vitro*, foi determinado que o tipo II é o genótipo mais prevalente (16,17). As cepas do tipo I são altamente virulentas e capazes de levar camundongos suscetíveis rapidamente à morte em condições experimentais, antes mesmo da persistência sob a forma de cistos teciduais (18). A mais comum entre estas, a cepa RH, foi isolada de um caso fatal de encefalite toxoplásmica em uma criança (19). Já as cepas do tipo II e tipo III são menos virulentas em comparação às do tipo I e são cistogênicas (20–22). Um exemplo de cepa do tipo II é a ME49, capaz de formar cistos e oocistos – estes dois estágios evolutivos também formam-se na cepa VEG, cepa do tipo III (23).

1.2. Ciclo e formas de vida

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida heteróxico, isto é, possui uma etapa de replicação assexuada em hospedeiros intermediários (virtualmente qualquer animal de sangue quente) (24). Já os hospedeiros definitivos (felídeos) comportam também a reprodução sexuada do parasito. O parasito tem três formas infectantes que são os principais estágios evolutivos: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Dentro do ciclo sexuada, observam-se formas intermediárias. A seguir, falaremos especificamente das três principais formas supracitadas.

1.2.1 Reprodução sexuada

Ocorre exclusivamente em felídeos e pode iniciar a partir da ingestão de qualquer forma infectante do parasito (25). Considerando o hábito de caça dos felídeos, é possível que estes se infectem após ingestão de pequenos roedores infectados contendo cistos teciduais (Figura 1.2).

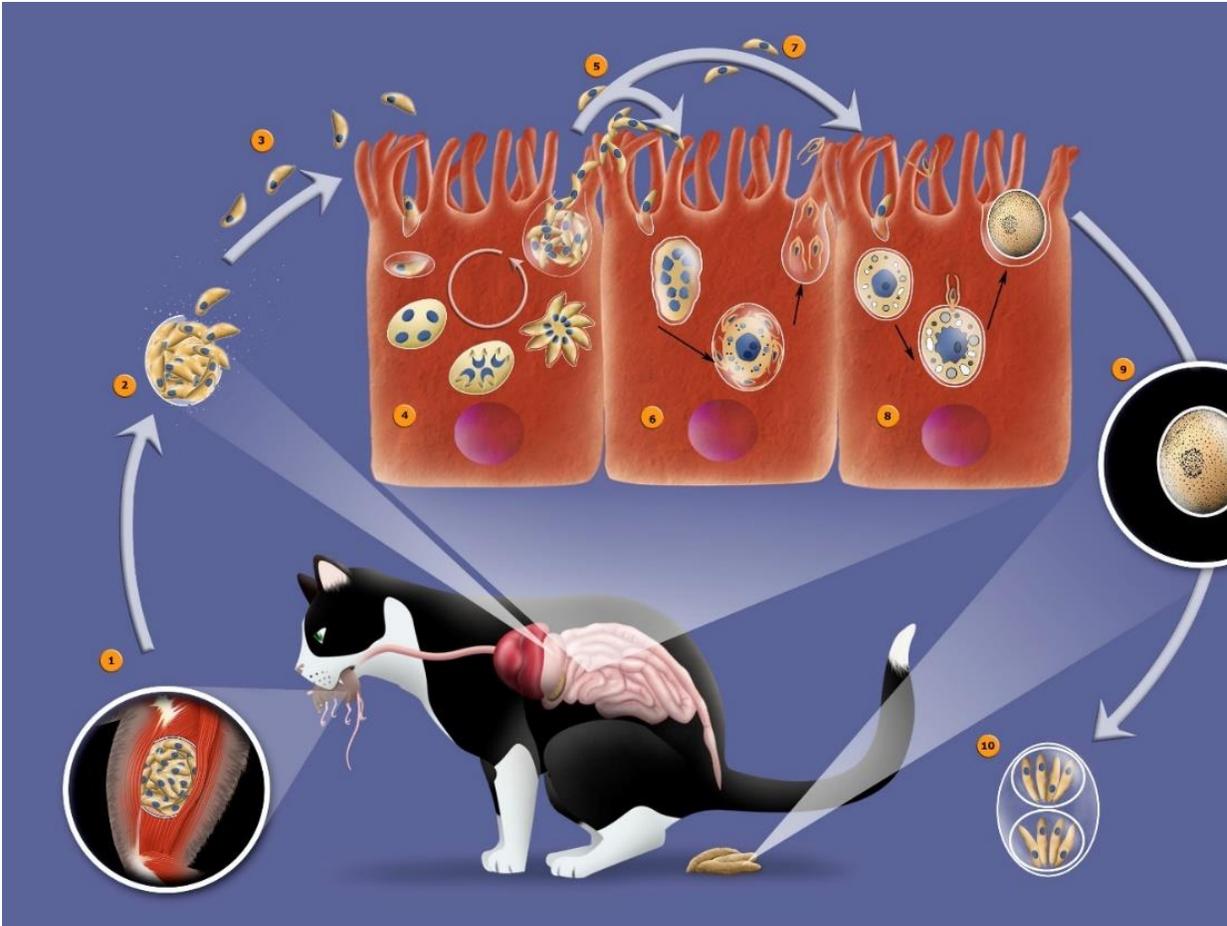


Figura 1.2. Ciclo sexuado no hospedeiro definitivo. (1) Ingestão de cistos teciduais por meio de carnivorismo. (2) Digestão da parede do cisto no estômago e intestino, liberando bradizoítos; (3) Bradizoítos invadem as células epiteliais do intestino; (4) Bradizoítos se diferenciam em esquizontes e se multiplicam por esquizogonia dando origem a vários merozoítos que rompem a célula hospedeira e infectam novas células; (5) Merozoítos dão origem a microgametas (6) ou um macrogameta (7); A fusão de ambos (8) resulta em um oocisto, que é liberado junto com as fezes do gato (9). No meio externo, os oocistos sofrem esporulação e amadurecem apresentando, no seu interior, dois esporocistos, cada um desses contendo quatro esporozoítos (10)(26).

Em seguida, a parede cística é rompida no estômago e intestino delgado dos felídeos a partir da ação de enzimas proteolíticas. Os bradizoítas liberados são capazes

de penetrar na parede intestinal e levar ao desenvolvimento dos cinco estágios enteroepiteliais (ou esquizontes) distintos do parasito. Especificamente na região jejunoileal dos felídeos ocorrem os processos de esquizogonia, gametogonia e esporogonia (27).

São os felídeos infectados que albergam o ciclo sexuado do *T. gondii* e liberam junto às fezes oocistos não esporulados, isto é, imaturos (8). O processo de **esporulação** (ou maturação) destas estruturas para que se tornem de fato infectantes ocorre no meio ambiente e dura de um a cinco dias (Figura 1.3). Fatores como oxigenação, umidade e temperatura são determinantes para o amadurecimento dos oocistos (28). Os **oocistos esporulados** (ou maduros) têm uma morfologia elíptica e em seu interior possuem dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos.

A liberação de oocistos imaturos ocorre durante um curto intervalo de tempo, de uma a duas semanas na vida do felídeo (25). O animal libera, de uma só vez, milhões de oocistos imaturos após ingerir apenas um bradizoíta ou cisto tecidual (23). A quantidade e o número de vezes que os gatos eliminam oocistos na natureza não são esclarecidos, já que menos de 1% da população destes animais é encontrada liberando estas formas evolutivas (27). Como a liberação de oocistos por gatos infectados ocorre aos milhões, e é grande o número de gatos domésticos com acesso às ruas, vários trabalhos já reportaram a presença de *T. gondii* no solo, em areias de parques públicos e até no mar (29,30).

1.2.2 Reprodução assexuada

O produto da reprodução assexuada são os cistos teciduais. Estes cistos são formados após a replicação intracelular do parasito e estabelecimento de latência em sítios de tropismo, como a musculatura esquelética e o sistema nervoso central. Os cistos teciduais podem ficar latentes durante toda a vida do hospedeiro graças ao seu caráter não imunogênico, o que evita sua eliminação pelo sistema imune (28).

A ingestão de cistos teciduais junto à carne crua ou malcozida, sobretudo de suínos, constitui a principal causa de infecção em humanos (31). Os cistos teciduais rompem-se sob ação das enzimas gástricas proteolíticas e liberam os bradizoítos (do grego *bradi* = lento). Estes penetram ativamente nas células epiteliais intestinais (enterócitos), primeiro tipo celular acometido pelo parasito após sua chegada a partir da via oral, onde ocorre a conversão em taquizoítos.

Os taquizoítos (do grego: *taqui* = rápido) são formas evolutivas de disseminação e replicação rápida dentro do hospedeiro intermediário. Infectam as células, preferencialmente, por penetração ativa (27) e se estabelecem em vacúolos parasitóforos. A multiplicação dentro destes vacúolos ocorre a partir da endodiogenia, uma forma de multiplicação assexuada onde duas células-filhas formam-se no interior de uma célula-mãe (32). As células podem ser permissivas à multiplicação do parasito e à interconversão em bradizoítas, forma evolutiva encontrada nos cistos teciduais (8). Outra possibilidade é invadir células imunes - como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas - capazes de disseminar a infecção a partir de um mecanismo conhecido como Cavalo de Troia (33–35).

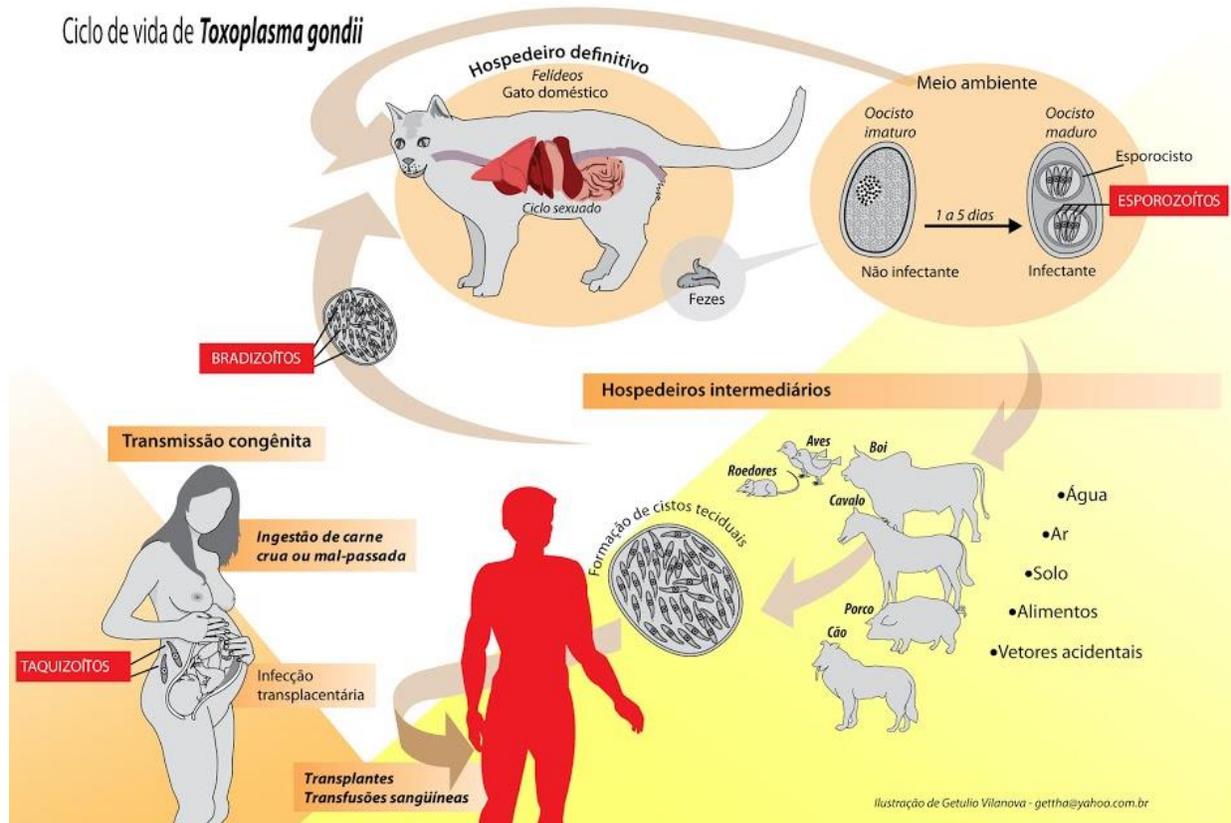


Figura 1.3. Ciclo de vida de *T. gondii*. O ciclo sexual ocorre exclusivamente na região jejunoileal de felídeos, hospedeiros definitivos, após ingestão de cistos teciduais do parasito. Junto às fezes são liberados oocistos imaturos que levam até 5 dias para serem infectantes e podem contaminar água, ar, solo e alimentos. Uma vez ingeridos, estes oocistos maduros e infectantes rompem-se sob ação das enzimas gástricas, liberando os parasitos que sofrerão conversão em taquizoítos. Estes últimos infectarão as células epiteliais intestinais e, em seguida, fagócitos profissionais, tais como macrófagos e células dendríticas. Findado o ciclo lítico intracelular, ocorre a interconversão de taquizoítos em bradizoítos, levando os hospedeiros intermediários a desenvolverem cistos teciduais. Uma outra forma de infecção é por meio de transplantes e transfusões sanguíneas, uma vez que os taquizoítos transitam pela via hematogênica – porta de entrada destes para a transmissão transplacentária, a forma mais grave da toxoplasmose. A toxoplasmose congênita ocorre a partir da ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais, ou pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos. Adaptado de (36).

1.3. Manifestações clínicas e tratamento

A sintomatologia da toxoplasmose é inespecífica. Em alguns indivíduos, mesmo após a infecção, pode não haver manifestações clínicas. Em geral, os sintomas na fase aguda são semelhantes a um quadro gripal, e incluem aumento dos linfonodos e dores musculares (37). Manifestações mais graves incluem lesões oftalmológicas e cerebrais, como retinocoroidites e convulsões, respectivamente. Estas manifestações podem ocorrer em indivíduos adultos após primo-infecção e em indivíduos infectados durante a primeira infância que tenham um evento de imunodepressão (por exemplo: indivíduos acometidos por doença autoimune, como Lúpus) e subsequente reativação do parasito, quando os cistos teciduais rompem-se e liberam os bradizoítos, que infectam novas células e reiniciam o ciclo (27). A dispersão do parasito ocorre pelas vias hematogênica e linfática, podendo alcançar o sistema nervoso central e o concepto em desenvolvimento, levando às duas formas mais graves da doença: a neurotoxoplasmose e a toxoplasmose congênita.

O tratamento da toxoplasmose consiste principalmente na administração da tríplice pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (38). A posologia depende da apresentação da doença, sendo diferente entre indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, como pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês *AIDS*). O tratamento em gestantes também tem particularidades, variando a depender do trimestre de gestação: por exemplo, a espiramicina é indicada apenas no primeiro trimestre, pois não atravessa a barreira placentária (38). Em contrapartida, neste período deve-se evitar a tríplice pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico, pois a pirimetamina tem efeito potencialmente teratogênico (39,40). A partir da 18ª semana de gestação, a gestante é tratada com a tríplice, pois a espiramicina já não tem mais eficácia no tratamento.

1.3.1 Neurotoxoplasmose e Imunodepressão

O *T. gondii* alcança o sistema nervoso central porque é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica (41,42). Pacientes com *AIDS* são altamente suscetíveis à toxoplasmose

cerebral, uma vez que a supressão do sistema imune é um requisito para reativação dos cistos teciduais. A toxoplasmose está no topo do *ranking* de doenças que levam pacientes imunodeficientes à morte. Aproximadamente 10% dos pacientes com AIDS nos Estados Unidos e 30% na Europa morrem de toxoplasmose – embora o parasito possa afetar outros órgãos destes pacientes, o mais comum é haver lesões cerebrais graves (28). Em um estudo mais recente realizado na Colômbia com pacientes HIV positivos, verificou-se que 31% destes pacientes foram internados por manifestações cerebrais da toxoplasmose (43). As manifestações cerebrais incluem dores de cabeça bilaterais fortes e persistente que respondem mal a analgésicos. À medida que a infecção progride, os sintomas observados passam a ser letargia, confusão, ataxia e até coma (28). A principal lesão observada no cérebro é a necrose, sobretudo do tálamo (44).

1.3.2 Toxoplasmose congênita

Diversos patógenos são capazes de atravessar a placenta e provocar doenças, uma vez que sejam transmitidos aos conceptos. Estas doenças são conhecidas coletivamente pelo acrônimo TORCH que significa: *Toxoplasmosis*, *Others* (do inglês: “outros”), *Rubeola*, *Cytomegalovirus*, *Herpes vírus* (45). A forma congênita da toxoplasmose ocorre quando os taquizoítos ganham acesso à circulação sanguínea materna e, por esta, alcançam a placenta e o conceito em desenvolvimento, uma vez que a placenta é irrigada por sangue materno (46).

A toxoplasmose congênita pode ocorrer durante a primo-infecção de gestantes com o parasito, seja a partir da ingestão de oocistos presentes em água ou hortaliças, seja a partir do consumo de carne contendo cistos teciduais, bem como por eventos de imunodepressão durante a gestação, onde é observada uma reativação da doença. Esta forma da doença pode causar danos neurológicos ou oculares nos conceptos durante a gestação. Dentre os sinais clássicos de toxoplasmose congênita estão, em casos de infecção no primeiro trimestre de gestação, abortos espontâneos e bebês natimortos. Nos casos de infecções no segundo trimestre, as sequelas incluem hidrocefalia e calcificações cranianas. Se a infecção ocorrer no terceiro trimestre, alguns recém-

nascidos podem ser assintomáticos e vir a desenvolver as sequelas durante a infância ou vida adulta – como retinocoroidites, uveítes e convulsões (47).

A taxa de transmissão vertical é diretamente proporcional ao trimestre de gestação (48), uma vez que a placenta dispõe de uma rede de vasos e irrigação sanguínea mais complexa em comparação aos trimestres iniciais. Em contrapartida, os danos tendem a ser mais graves quanto menor a idade gestacional – com treze semanas, há 61% de probabilidade das crianças desenvolverem os sinais clínicos supracitados antes dos três anos de idade (Figura 1.4) (48).

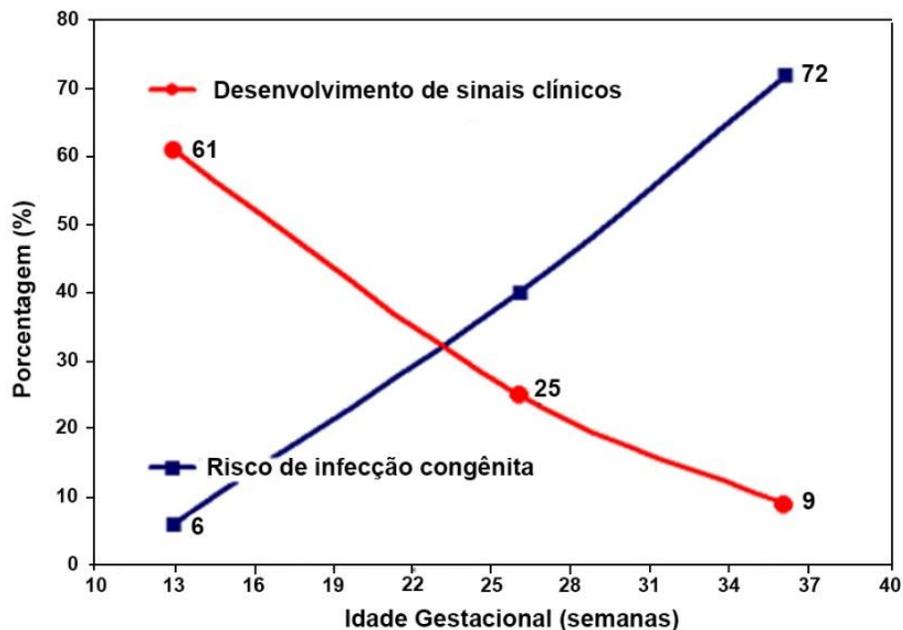


Figura 1.4. Toxoplasmose congênita em mulheres. O sangue de gestantes com diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita foi colhido e a fração do soro foi analisada em busca de anticorpos de fase crônica (IgG) ou aguda (IgM) para *T. gondii*. Ainda, os neonatos foram avaliados e acompanhados por até 12 meses de vida, para determinação das manifestações clínicas da toxoplasmose congênita nestes. A partir deste estudo, foi determinado que uma maior porcentagem de bebês desenvolvia sinais clínicos (61%) quando o risco de infecção congênita era menor, em 13 semanas.

Em contrapartida, apenas 9% desenvolveriam sinais clínicos quando a infecção ocorresse em semanas mais avançadas de gestação (36-37), embora o risco de infecção congênita fosse o maior de todos (72%). Adaptado de (48).

A *priori* acreditava-se que a soropositividade materna ao parasito, antes da gestação, conferia proteção em caso de reinfecção (49). Ou seja, somente em casos onde a primo-infecção ocorre durante a gestação é que haveria a transmissão congênita. No entanto, eventos de recrudescência – isto é, reativação dos cistos teciduais de mulheres previamente infectadas e agudização da doença – já foram reportados. Um exemplo é o caso de uma mulher que sabidamente tinha toxoplasmose crônica e durante a gestação ingeriu carne malpassada de cavalo contendo cistos teciduais (50). Ao nascimento, os médicos observaram múltiplos focos de coriorretinite em ambos os olhos do recém-nascido e o diagnóstico molecular, via PCR, 8 dias pós nascimento, confirmou a infecção do bebê pelo parasito (50).

Por causa da sintomatologia inespecífica, a toxoplasmose congênita levou alguns anos até ser percebida pela literatura médica e científica. Em geral, era confundida com outras infecções *TORCH*, até que as biópsias começaram a apontar para outro possível patógeno. Em 1939, Wolf, Cowen e Paige demonstraram a presença do parasito em lesões granulomatosas em um recém-nascido de 31 dias (51). Dois anos depois, Sabin observou o parasito e também lesões, a partir de biópsia, no sistema nervoso central de uma criança de oito anos (19). A partir dos isolados clínicos, diferentes autores buscaram, na experimentação animal, compreender melhor a forma congênita da doença. Em 1950, Cowen e Wolf postularam, a partir dos achados num modelo murino de toxoplasmose congênita, que a infecção se dava a partir da chegada do parasito pela circulação materna – sustentados pelas evidências de focos necróticos e proliferativos do parasito em diferentes regiões da placenta de camundongos (52).

2. Modelos animais em toxoplasmose congênita

Modelos de toxoplasmose congênita têm sido descritos desde 1950, inicialmente usando camundongos, justamente pela proximidade anatômica entre as placentas humanas e murinas (52). Embora os modelos murinos sejam maioria, muitos trabalhos envolvendo outros modelos – roedores como *Calomys callosus*, hamsters e ratos, além de mamíferos maiores, como ovelhas e porcos – também foram utilizados para elucidar diferentes aspectos da manifestação congênita da toxoplasmose (53–57).

Foi com um modelo de toxoplasmose congênita em *C. callosus*, reservatório para diversos patógenos - incluindo o *T. gondii* - que se descobriu que os sinciciotrofoblastos são infectados com o parasito a partir do primeiro dia de infecção, durante o processo de implantação do embrião (54). A maior contribuição deste trabalho foi elucidar a rota de acesso do parasito ao embrião: a partir da rota hematogênica, em contato direto com os sinciciotrofoblastos; além disso, este trabalho mostrou que a invasão do parasito não se restringe aos estágios mais tardios de infecção, como havia sido demonstrado alguns anos antes em modelos de infecção de porcos e ovelhas (57). Modelos de toxoplasmose congênita em hamsters recapitulam aspectos da toxoplasmose congênita humana: não há transmissão congênita quando a mãe é cronicamente infectada (55).

Numerosos trabalhos propuseram modelos de toxoplasmose congênita com ratos, sobretudo objetivando investigar aspectos da imunidade e resposta a terapias e vacinas. O modelo experimental destes trabalhos incluía, no geral, o desafio imunológico de fêmeas 1 ou 2 meses antes da concepção, uma nova infecção durante a gestação e, na ocasião do parto ou cesárea, o bioensaio dos tecidos fetais em camundongos saudáveis (56,58,59). Este modelo foi refinado em 2008, analisando-se o ganho de peso dos animais e a detecção de plugue vaginal, para confirmar a gestação das ratas (60). Muito embora a metodologia empregada tenha apresentado alta sensibilidade (84%) e especificidade (60%) como modelo de toxoplasmose congênita, ratos requerem mais espaço físico, têm uma manutenção mais cara e são mais complexos de manipular do que camundongos, sendo preteridos a estes.

Os camundongos são utilizados há muito tempo para o bioensaio, que consiste na inoculação dos animais com tecidos ou amostras de hospedeiros infectados para confirmação da infecção e isolamento de cepas. Foi em 1950, como citado no início desta seção, que os camundongos começaram a ser utilizados como modelo em toxoplasmose congênita de fato. Outras vantagens de utilização destes animais como biomodelo incluem: correspondências histológicas e funcionais entre a placenta humana e murina e, por conseguinte, semelhanças no desfecho da doença: os camundongos são a espécie mais suscetível à infecção por *T. gondii*, representando, portanto, um excelente modelo para a toxoplasmose congênita (21).

2.1 Anatomia da placenta humana e murina

A placenta é o órgão central na transmissão vertical de patógenos. É um órgão formado por tecidos maternos e fetais e suas principais funções são a nutrição do feto, a promoção de trocas gasosas e proteção frente a infecções (61,62). Esta proteção é viabilizada a partir de duas barreiras placentárias: a física e a imunológica. A barreira física é composta pelas diferentes camadas de trofoblastos, unidos a partir de proteínas de junção e adesão célula-célula. A proteína de zona de oclusão 1 (ZO-1) serve como guia para a polarização apical-basal das células placentárias, de modo a permitir e controlar a transferência de biomoléculas e patógenos, e pode ter sua expressão perturbada quando ocorrem infecções (63,64).

Com relação ao aspecto imunológico da placenta, observa-se a presença de receptores do tipo *toll* (TLR) nos trofoblastos e sinciciotrofoblastos. Estes últimos têm uma resistência intrínseca à infecção por *T. gondii*, e justamente estas células estão em contato direto com o sangue materno (46). Os sinciciotrofoblastos restringem a infecção do parasito em dois estágios: no momento da adesão do parasito à célula e durante a replicação intracelular (65). Ainda, há um processo de renovação epitelial da placenta (em inglês, *epithelial turnover*) capaz de levar à apoptose parasitos que estejam em processo de adesão ou que tenham ingressado em sinciciotrofoblastos (66).

As placentas humanas e murinas compartilham muitas características, o que viabiliza a criação de modelos de toxoplasmose congênita em roedores. Uma destas características é quanto à irrigação sanguínea, pois nas duas há o contato direto entre o sangue materno e os vilos placentários. Em humanos, estes vilos são compostos por diferentes populações de trofoblastos, dentre eles: sinciotrofoblastos (SIN), banhados em sangue materno; trofoblastos extravilosos (TEV), responsáveis pela ancoragem da placenta à decídua, e esta responsável por delimitar o embrião no saco coriônico; os trofoblastos mononucleares subsinciciais (TMS), imediatamente abaixo dos SIN e acima da membrana basal, que conferem uma barreira física adicional (61).

A placenta murina dispõe de uma região de trocas gasosas chamada **labirinto**, composta pelos vilos placentários e duas outras populações análogas aos TEV humanos: as células trofoblásticas gigantes (CTG) e os espongiotrofoblastos (EpT). No labirinto são observados pontos de contato com o sangue materno. Em contato direto com o sangue materno, há os trofoblastos mononucleares (TMN) – em uma camada descontínua de células. Imediatamente abaixo, localizam-se os SIN murinos, o endotélio fetal e membrana basal (61).

A Figura 1.5 ilustra as diferenças estruturais e populações celulares descritas neste capítulo.

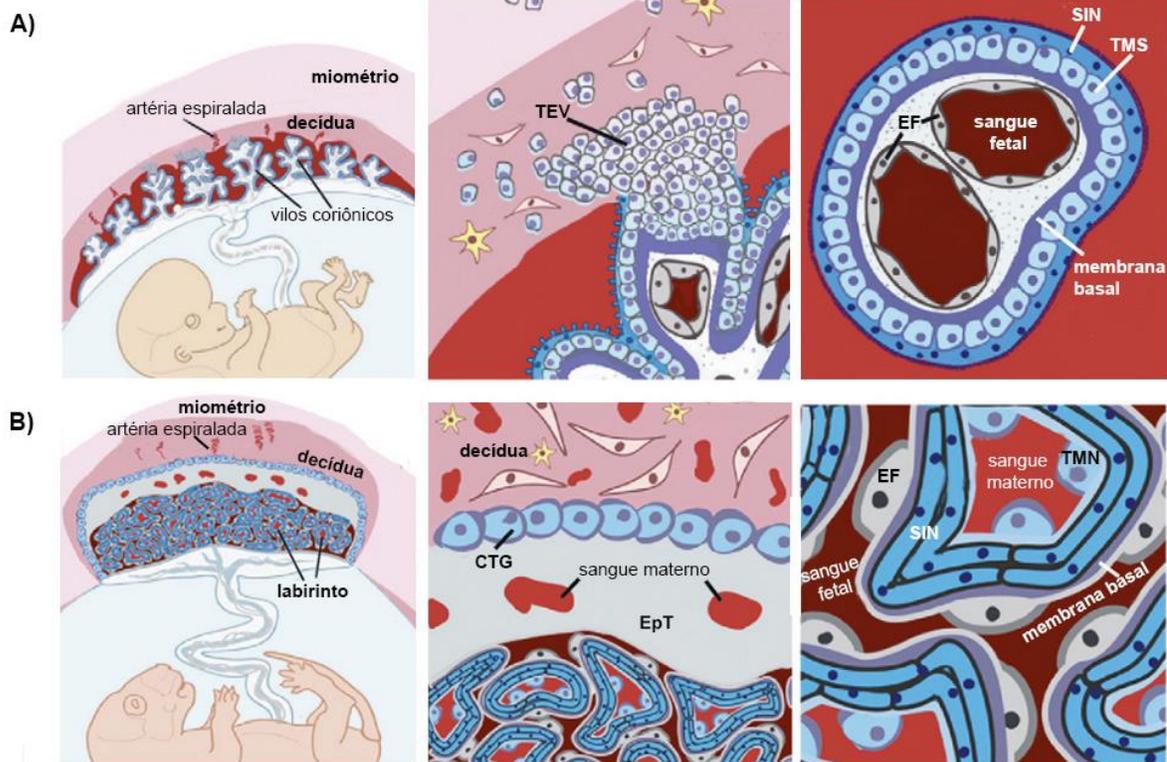


Figura 1.5. Diferenças entre as placentas humanas e murinas. A placenta humana é considerada hemocorial, ao passo que a murina é hemotricorial, com três camadas de trofoblastos entre a circulação materna e fetal. **A)** A placenta humana organiza-se em: artérias espiraladas que fornecem irrigação sanguínea. Estas estão ancoradas na decidua, e a decidua, no miométrio, musculatura uterina. Os vilos coriônicos são compostos por trofoblastos extravilosos (TEV), que invadem a decidua. Em contato direto com o sangue materno estão os sinciotrofoblastos (SIN), células que são resistentes à infecção e proliferação do *T. gondii*. Seguindo esta camada de SIN estão os trofoblastos mononucleares subsinciciais (TMS), população que se apresenta de forma semi descontínua à medida que a gestação avança. Por fim, a membrana basal sustenta estas duas populações celulares e também o endotélio fetal - em contato direto com o sangue fetal. **B)** Já a placenta murina apresenta a região do labirinto, em vez dos vilos coriônicos; no lugar dos TEV, vemos células trofoblásticas gigantes (CTG), responsáveis por delimitar o espaço entre a decidua o labirinto. Entre os CTG e o labirinto, estão os espongiotrofoblastos (EpT), compondo a zona juncional, associada à função endócrina da placenta. Na região do labirinto, o sangue materno é

delimitado por uma fina e descontínua camada de trofoblastos mononucleares (TMN), seguida por uma dupla camada de SIN. Estes, assim como na placenta murina, ancoram-se à membrana basal, precedida pelo endotélio fetal e sangue fetal. Modificado de (61).

2.2 Toxoplasmose congênita em camundongos

A partir da observação que os parasitos ganhavam acesso à placenta a partir do sangue materno, evidenciada pela infecção na região do labirinto (52), outros trabalhos buscaram compreender melhor a relação parasito-hospedeiro na transmissão vertical e os impactos da infecção no feto. Uma revisão sistemática mostrou que as principais linhagens de camundongo utilizadas em estudos de toxoplasmose congênita incluem: BALB/c, C57BL/6, CBA/J e Swiss Webster (67). No entanto, há muitas divergências experimentais entre os trabalhos; existem muitos modelos de toxoplasmose congênita, o que dificulta a comparação entre os diferentes resultados observados.

A literatura em toxoplasmose congênita experimental em camundongos, frequentemente, não fornece informações assertivas quanto à presença de reabsorções uterinas ou abortamentos. Nestes trabalhos, a porcentagem da prole que estava efetivamente infectada não foi determinada, pois os autores utilizam um *pool* de fetos ou placentas para as análises (67).

Dentre as cepas e formas evolutivas utilizadas, observam-se todos os estágios evolutivos (taquizoítos, cistos teciduais ou oocistos) e diferentes rotas de infecção (intraperitoneal, intragástrica, oral) (67). Quanto à carga parasitária administrada, os autores reforçam que um cisto tecidual é capaz de conter de dezenas a milhares de bradizoítos – e basear a carga de infecção experimental a partir deste estágio evolutivo gera heterogeneidade nos achados (67). Por isso, em 2016, camundongos da linhagem BALB/c foram infectados, via intravenosa (i.v.), com taquizoítos da cepa ME49 (68). Este foi o primeiro trabalho a utilizar a via i.v. como uma rota de infecção, respaldado pelo acesso natural dos parasitos aos conceptos – que é via hematogênica. Foi elaborado um modelo de toxoplasmose congênita comparável ao segundo trimestre de gestação

humana, contendo inclusive taxas de transmissão semelhantes às previamente observadas em humanos (48,68). Ainda, a placenta foi o tecido que mais continha parasitos, funcionando como um filtro e impedindo que os parasitos ganhassem acesso aos conceptos (68).

Camundongos da linhagem BALB/c parecem ser bons candidatos para estudos envolvendo toxoplasmose congênita aguda, pois permitem a transmissão vertical na fase aguda, mas não na fase crônica da doença – tal qual ocorre em humanos (21). Com relação à manutenção da gestação, camundongos BALB/c tendem a ter proles maiores e com menor taxa de reabsorções em comparação com os animais C57BL/6 (69). Esta diferença está diretamente relacionada à resposta imune evocada pela infecção: embora não sejam observados muitos parasitos no útero e na decídua, a infecção favorece o aumento do perfil inflamatório do tipo Th1, deletério à manutenção da gestação (70).

A gestação depende de um balanço Th1-Th2 correto, onde as citocinas deste segundo tipo, com um perfil anti-inflamatório e permissivo à gestação, estejam em maior quantidade (71). No entanto, a infecção por *T. gondii* perturba este balanço, aumentando as citocinas deletérias à gestação, como o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (71). Os camundongos C57BL/6 são suscetíveis à infecção congênita pelo parasito, com alta produção de IFN- γ e alta carga parasitária de úteros e placentas. Já nos animais BALB/c – definidos como resistentes à infecção – as cargas parasitárias destes tecidos foram menores (71). Ainda, filhotes de camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* e geneticamente modificados para não expressarem o gene do IFN- γ apresentam, ao nascer, um peso corporal significativamente menor que os animais selvagens – e ao longo de seu crescimento (5 semanas pós-parto), mantém este padrão (71). Apesar da sorologia negativa, foram reportados danos neurológicos nestes animais 5 semanas após o nascimento (71).

Os modelos de toxoplasmose congênita com linhagens não-isogênicas são infrequentes, de acordo com uma revisão sistemática (67). A linhagem Swiss Webster só foi reportada em modelos de segundo trimestre de gestação. A prole destes animais é maior que a prole de animais isogênicos, como os BALB/c ou C57BL/6 (67), contendo em média 9 filhotes por ninhada – e deste total, 94% estavam infectados (72). Em outro

estudo envolvendo Swiss Webster no mesmo período gestacional, 100% da prole estava infectada ao nascer (73). Os camundongos não-isogênicos não são muito utilizados por motivos de heterogeneidade nas respostas; animais isogênicos respondem de forma mais homogênea às intervenções farmacológicas em comparação aos animais não-isogênicos, o que permite o uso de menos animais nas pesquisas (74). Em contrapartida, animais não-isogênicos têm uma fertilidade maior, o que gera proles maiores em comparação aos animais isogênicos (74). Do ponto de vista experimental e ético – alinhado ao princípio dos “3 Rs”, dispor de mais filhotes por fêmea para analisar o desfecho da toxoplasmose congênita é mais interessante do que utilizar mais fêmeas para, assim, obter mais filhotes para as mesmas análises. Deste modo, estaríamos reduzindo o número de animais utilizados na pesquisa.

Uma vez que animais não-isogênicos tenham uma prole maior e já sejam usados para a experimentação – como por exemplo, no bioensaio, onde extratos de tecido potencialmente infectado são inoculados na cavidade peritoneal de camundongos –, seria interessante investigar o desempenho destes animais num modelo de toxoplasmose congênita. Como foi esclarecido ao longo desta seção, existem numerosos modelos de toxoplasmose congênita em diversas linhagens de roedores – e, especificamente, de camundongos. Logo, estabelecer um modelo de toxoplasmose congênita em linhagem não-isogênica seria de grande valia para o avanço da compreensão da doença e do ponto de vista sustentável de redução de animais.

3. Autofagia

Autofagia pode ser compreendida como um processo provedor de nutrientes necessários à sobrevivência celular pela degradação autóloga de componentes celulares, como proteínas e/ou organelas, em resposta a privação nutricional, dentre outras condições de estresse. Este processo foi descrito em 1950 por Christian de Duve

durante a observação de lisossomos em células de mamífero. À época, estas organelas foram observadas repletas de hidrolases digestivas em seu interior – necessárias à degradação de componentes celulares.

Grande parte dos achados em autofagia decorreu dos estudos com *Saccharomyces cerevisiae*, onde foram descobertos mais de 30 genes ATG (*AuTophaGy-related*) codificadores de mais de trinta proteínas envolvidas na via de autofagia – grande parte ortólogas às proteínas observadas em outras leveduras, fungos, mamíferos e plantas (75).

Além de garantir a sobrevivência celular, a autofagia é um mecanismo inato para remoção de organelas e/ou estruturas danificadas – como mitocôndrias e agregados proteicos intracelulares – e reaproveitamento dos nutrientes obtidos a partir desta digestão autóloga (76). A autofagia ainda favorece o processo de renovação celular de tecidos e proteção frente a infecções, como será discutido mais adiante.

A autofagia pode ser classificada como seletiva ou não-seletiva. Seletiva à medida em que é capaz de identificar e reciclar organelas, como mitocôndrias e peroxissomos, além de proteínas que disponham de um motivo de aminoácidos específicos (77,78). Isto porque existem proteínas da via de autofagia que interagem com moléculas adaptadoras na organela ou proteína-alvo. Por exemplo, Th1p e Atg32 são proteínas que, em leveduras, promovem a captação e reciclagem de mitocôndrias (mitofagia) (79). Agregados proteicos poliubiquitinados, por outro lado, são reconhecidos de forma seletiva pelas proteínas p62/SQSTM1, as quais falaremos mais profundamente adiante.

Já a forma não-seletiva é, primariamente, uma resposta ao estresse nutricional. Esta condição regula negativamente proteínas que inibem a autofagia: o complexo mTORc1 (76). Desta forma, os lisossomos são capazes de degradar porções citosólicas ou organelas inteiras, sem interação específica com receptores, para manter a homeostase e sobrevivência. Por exemplo, a degradação não-seletiva de ribossomos pode ser disparada em estresse nutricional – já que estas organelas compreendem grande parte das proteínas celulares – e também para regular o número de ribossomos nas células (80).

Até o momento foram caracterizados três tipos de autofagia: macroautofagia (também chamada apenas de autofagia), microautofagia, e autofagia mediada por chaperona (AMC). Estas três formas foram sumarizadas na Figura 1.6.

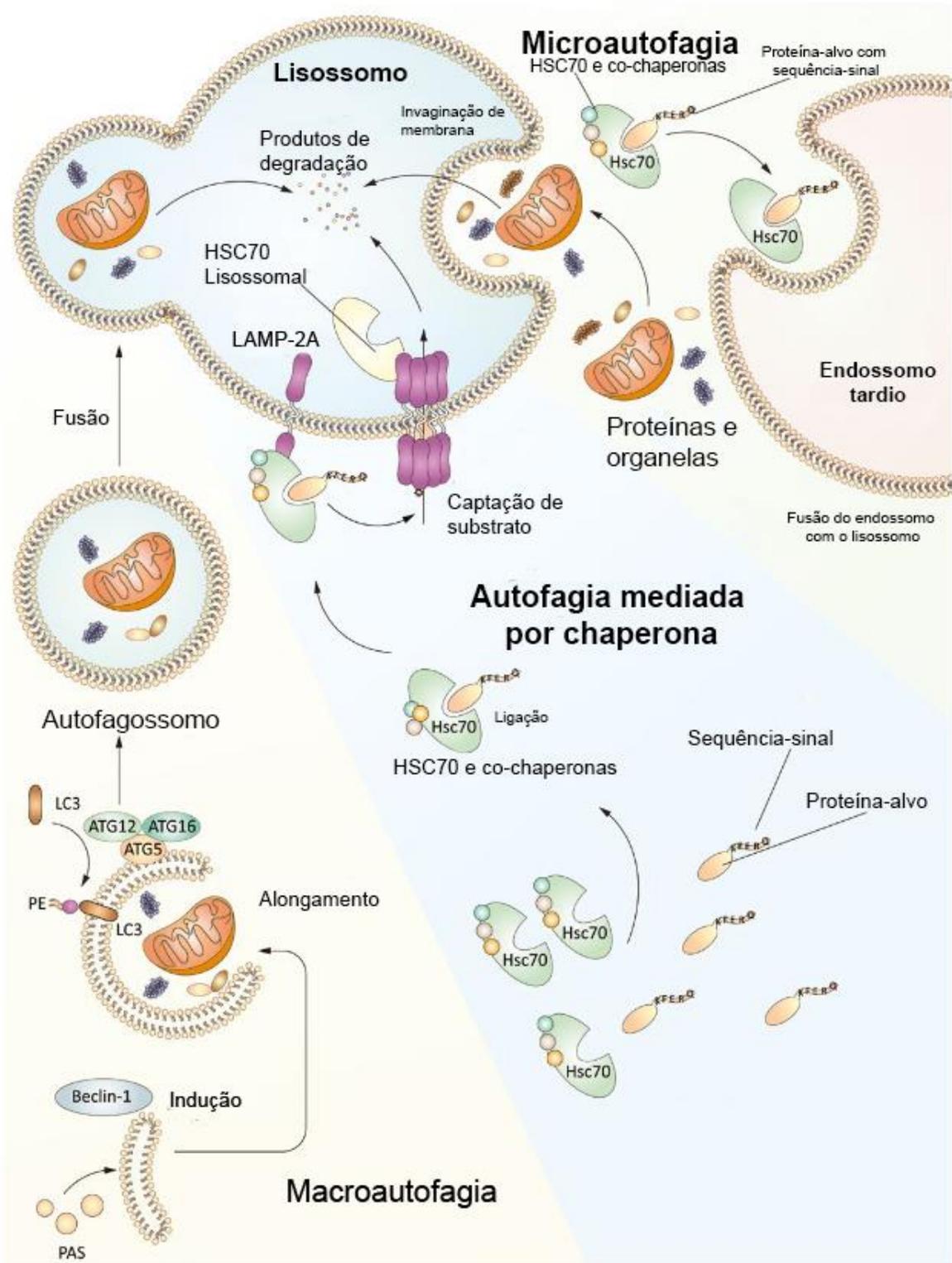


Figura 1.6: Tipos de autofagia. Na macroautofagia, uma porção do citosol, incluindo organelas inteiras, como mitocôndrias – é envolvida por uma membrana intracelular denominada fagóforo para formar um autofagossomo. Uma das proteínas envolvidas nessa etapa é a Beclina-1. A seguir, ocorre o alongamento do fagóforo e lipidação da proteína LC3, presente na membrana do autofagossomo, processo este dependente das proteínas ATG12, ATG16 e ATG5. O autofagossomo se funde com lisossomo e ocorre a degradação do seu conteúdo. Já na microautofagia, observam-se invaginações na superfície dos lisossomos, que resultam na internalização do material a ser degradado, sem a formação de autofagossomos. A terceira forma de autofagia é a autofagia mediada por chaperona (AMC), onde chaperonas medeiam a entrada de proteínas com determinadas sequências-sinal através da ligação a proteína LAMP-2A lisossomal. A forma multimérica da LAMP-2A permite a internalização das proteínas captadas pelas chaperonas. Modificado de (83).

Na macroautofagia, há a presença de autofagossomos, organela especializada em levar a sua carga para degradação nos lisossomos (Figura 1.7). Na microautofagia a membrana lisossomal sofre invaginações, gerando pequenas vesículas contendo o material a ser degradado no interior dos lisossomos, sem a presença de autofagossomos (77,81). Já na AMC, uma chaperona carreadora da molécula-alvo se liga à LAMP-2A promovendo a sua dimerização na membrana lisossomal, gerando um canal por onde a proteína alcança o interior da organela para ser degradada (82). A seguir, aprofundaremos a macroautofagia, foco desta dissertação.

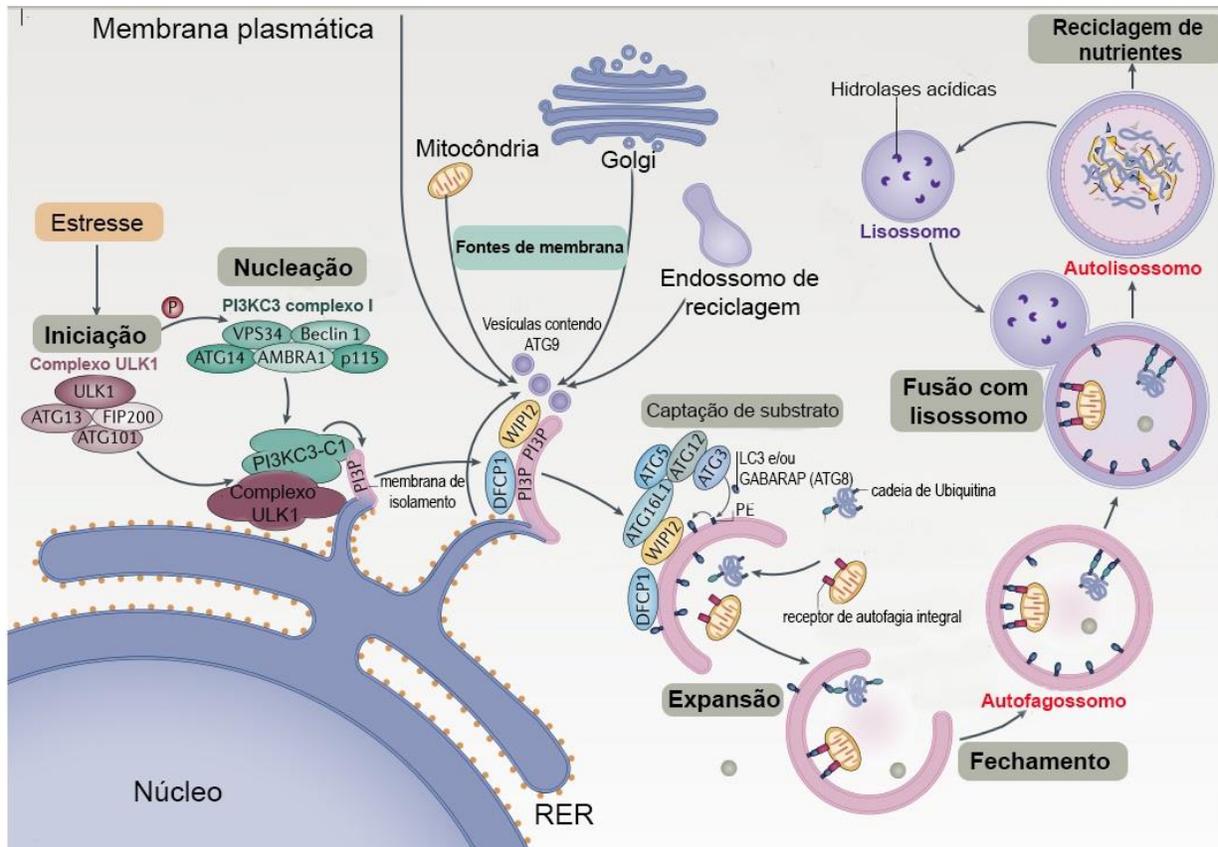


Figura 1.7. Macroautofagia em células de mamíferos. Diferentes estressores disparam a macroautofagia, como estresse oxidativo, privação nutricional, dentre outros. O principal alvo desses estressores é o complexo ULK1. A seguir, ocorre a nucleação pelo complexo 1 de PI3KC3. Algumas fontes de membrana para os autofagossomos incluem: mitocôndrias, Golgi e endossomos, de onde brotam vesículas contendo Atg9. O fagóforo se alonga e inicia a captação de substrato por LC3 lipidado e/ou proteínas ATG8, como GABARAP. O LC3 está localizado na membrana interna e externa do fagóforo. Com o englobamento dos substratos e fechamento do autofagossomo ocorre a fusão com lisossomo, organelas repletas de hidrolases ácidas que irão degradar o conteúdo do autofagossomo. Quando ocorre a fusão, o fagóforo é denominado autolisossomo. O produto da digestão enzimática é reciclado, e os nutrientes aproveitados pela célula. Modificado de (76).

3.1.1 Macroautofagia

Como dito anteriormente, na autofagia, organelas ou macromoléculas são englobadas por uma estrutura de dupla membrana, formando o autofagossomo, que em seguida sofre fusão com lisossomo, degradando a sua carga. Em *S. cerevisiae* foram descritas muitas proteínas Atg. Entre estas, 18 em seis grupos distintos são responsáveis por formar o autofagossomo: o complexo Atg1, a proteína Atg9, o complexo fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), o complexo Atg2-Atg18 e os sistemas de conjugação Atg8 e Atg12 (84).

Quando induzida a autofagia, ocorre a formação do sítio de montagem do fagóforo, crucial para a formação do autofagossomo. A primeira etapa para isto é a montagem do complexo Atg1. Uma vez formado, este complexo recruta Atg9 e o complexo específico de autofagia, ULK1 e PI3KC3-C1.

Outra importante proteína na etapa inicial é a Beclina-1, promotora da formação de PI3KC3-C1 e reguladora da quinase de lipídio VPS34. VPS34 é o componente catalítico de PI3KC3-C1 e estabilizadora do complexo ULK1 (76). A nucleação do autofagossomo ocorre em geral a partir do brotamento de membranas do retículo endoplasmático, membranas estas que contém fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) e colaboram para a formação do fagóforo (84).

O gatilho para indução de autofagia melhor caracterizado até o momento é a privação de aminoácidos, capaz de inibir o complexo proteico mTORC1, responsável por regular a autofagia (76). ATG13 e ULK1 estão diretamente ligadas e fosforiladas por mTORC1, permanecendo inativas. Após o estímulo autofágico, ocorre desfosforilação de ULK1 e dissociação do complexo mTORC1 (76).

A expansão do fagóforo fica a cargo dos membros da família de proteínas ATG8 (LC3) Ub-símile. Nesta etapa, as pró-LC3 sofrem processamento na sua porção C-terminal pela ATG4 – isto leva a exposição de um resíduo de glicina essencial para a conjugação de LC3 (proteína de cadeia leve tipo 3) ao fosfatidilinositol (PE) (76). O complexo Atg5-Atg12-Atg16l fica responsável pela lipidação do LC3. A seguir as ATG8 são ativadas por ATG7 e conjugadas ao fosfatidilinositol associado à membrana do

fagóforo. Essa conjugação depende de ATG3 – que é convertida da forma difusa para a forma lipídica – e é esta forma lipídica da ATG8 que promove a expansão do fagóforo (76).

Ainda, LC3 facilita o recrutamento de material na macroautofagia seletiva, uma vez reconhecem os sinais de “*eat me*” presentes nos materiais, como galectinas ou cadeias de ubiquitinas. Assim, uma vez reconhecidos estes sinais, ocorre a ligação entre o material a ser englobado à membrana do fagóforo na região de interação com LC3, mediado por SQSTM1/p62 (sequestrassomo 1). Esta última acumula-se quando a macroautofagia é inibida, e seus níveis caem à medida que a macroautofagia avança.

LC3 é processada por Atg4, formando a forma não lipídica da LC3 (LC3-I). A ligação do fosfolípido PE na membrana do autofagossomo – isto é, a forma lipídica da LC3 (LC3-II), fica a cargo dos sistemas Atg7 e Atg3 e Atg5-12. À medida que o autofagossomo se expande, o complexo Atg5-Atg12-Atg16 dissocia-se da membrana deste, ao passo que a forma lipídica do LC3 (LC3-PE) permanece por toda a via – desde o alongamento da membrana, até após a fusão com o lisossomo; na face interna e externa do autofagossomo (85). Juntos, LC3 e p62 são excelentes marcadores para avaliação de autofagia: o primeiro, por estar presente durante toda a via; e o último, por ser degradado em condições normais e ser um indicativo do processo estar ocorrendo.

3.2 Autofagia na infecção

A xenofagia é um termo empregado para descrever a autofagia de patógenos, onde há a captura e direcionamento destes para lisossomos. É um processo seletivo imune celular descrito inicialmente para bactérias intracelulares (86,87). Aqui, os vacúolos onde se encontram bactérias são permeabilizados, ubiquitinados e a seguir ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, como p62/SQSTM e optineurina. Esta cascata leva ao recrutamento de LC3 e formação de autofagossomo. A partir disso, ocorre a fusão com lisossomos positivos para LAMP-1 e, por fim, a degradação do patógeno (87,88).

Com o seu papel no controle de infecções revisto em 2010 (89), a via autofágica parece ter se desenvolvido ao longo da evolução para tornar-se um sistema de controle de patógenos (89). Evidências crescentes mostram a participação da autofagia no controle de bactérias, vírus e parasitos em diferentes tipos celulares (88). Por se tratar de uma estratégia antimicrobiana celular, alguns patógenos – como o *T. gondii* – evoluíram a ponto de escapar desta maquinaria.

A partir de um modelo de fibroblastos embrionários humanos, foi demonstrado que *T. gondii* é capaz de induzir e se beneficiar da autofagia do hospedeiro. No tratamento das células infectadas com cloreto de lítio, um indutor da via autofágica, foi demonstrado que a autofagia induzida pelo parasito não era deletéria, mas favorecia a proliferação deste nas células hospedeiras. Em contrapartida, a administração de bafilomicina A1, um inibidor da via, reduzia o número de células infectadas e a proliferação dos parasitos nestas (90). Ou seja, a autofagia era benéfica para o parasito.

Por outro lado, na musculatura esquelética a autofagia parece exercer um efeito deletério ao parasito. Num modelo de cultura primária de musculatura esquelética, foi demonstrado que a autofagia controlou a proliferação dos taquizoítos dentro das células. Foram observadas alterações ultraestruturais compatíveis com autofagia bem como aumento no número de *puncta* de LC3 em células infectadas, duas abordagens experimentais validadas e preconizadas pelo Guia de Experimentos envolvendo Autofagia (91,92).

A maquinaria da via autofágica pode ser deletéria ao parasito mesmo na ativação não-canônica da via. O tratamento de células humanas com IFN- γ diminuiu a proliferação intracelular do parasito, mas não foi observado fusão dos vacúolos LC3 positivos com lisossomos. Em vez disso, o que se observou foi um mecanismo que dependia de ubiquitinação e de proteínas adaptadoras da via, como a p62. Neste processo, ocorria o englobamento do parasito em uma estrutura de múltiplas membranas, levando a uma redução da proliferação deste. Parasitos das cepas tipo I foram capazes de escapar desse englobamento, enquanto as do tipo II e III foram mais suscetíveis (88).

3.3 Autofagia na placenta

Os trofoblastos da placenta requerem níveis baixos de oxigênio nos estágios iniciais da gestação (entre a 7^a e a 11^a semana). Essa baixa tensão de oxigênio é necessária para a invasão e formação dos trofoblastos extravilosos (TEV). Esse ambiente hipóxico protege o feto do estresse oxidativo e os mecanismos envolvidos no ajuste dos trofoblastos a esse estresse são mediados pela autofagia (93). Falhas neste processo de invasão e formação dos TEV estão relacionados a uma falha na placentação, e podem causar quadros graves, como a pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal intrauterino. Portanto, a autofagia tem um papel fundamental no funcionamento da placenta. A ocorrência de polimorfismos na proteína Atg16L1, especificamente no resíduo Thr300Ala, impede a função autofágica e está relacionado a uma rápida progressão no parto (94).

Uma das estratégias protetivas da placenta frente a infecções é a autofagia. O parto prematuro é uma causa global de morbidade e mortalidade perinatal, e está comumente relacionado a infecções intrauterinas e placentárias (95). Dentre os patógenos que comumente estão associados a danos durante o desenvolvimento embrionário estão *Listeria monocytogenes*, *T. gondii* e o vírus Zika.

A compreensão do papel da autofagia em placentas humanas foi expandida em 2016, quando Gao e colaboradores avaliaram placentas provenientes de partos prematuros em 3 diferentes períodos (antes de 32, entre 32 e 37, e após 37 semanas). Os autores observaram que nas placentas do primeiro período (<32 semanas) havia um

menor fluxo autofágico e diminuição da expressão de ATG16L1. Ao perturbar a expressão de ATG16L1 murino, foi visto uma maior susceptibilidade à infecções bacterianas e aumento dos eventos de parto prematuro (95).

Outro mecanismo de proteção da placenta frente a infecções é a renovação das células do epitélio, onde os SIN, população celular em contato íntimo com o sangue materno, sofrem renovação numa frequência maior que os demais subtipos de trofoblastos (66). Essa renovação é análoga à observada no epitélio da derme humana e, portanto, uma barreira imune primária à adesão e penetração de patógenos. Na renovação epitelial placentária, parasitos com afinidade por este tecido sofrem apoptose junto às células hospedeiras, não disseminando a infecção pelos outros trofoblastos (66). Após a apoptose dos SIN, os trofoblastos localizados na camada imediatamente inferior – citotrofoblastos – se diferenciam em sinciciotrofoblastos, e assim segue o ciclo de renovação epitelial.

Já se sabe que o *T. gondii* infecta diferentes populações celulares da placenta (46), embora afete os SIN em menor proporção. Este tipo celular parece ser resistente à infecção pelo parasito (65). Curiosamente, os SIN de placentas provenientes de parto normal (dentro do período esperado) apresentavam maior expressão de LC3 que os CIT nas mesmas condições (95), sugerindo que os níveis de autofagia poderiam estar correlacionados com a sincicialização, processo onde os citotrofoblastos se diferenciam em SIN. Esta hipótese foi confirmada após tratamento de uma linhagem de citotrofoblastos (BeWo) com um indutor de sincicialização (forskolina), onde foi observado aumento do número de *puncta* de LC3 nas células sincicializadas.

A partir destes trabalhos explorando a infecção em placentas e da descoberta da autofagia como um mecanismo protetivo deste tecido, o impacto da modulação da autofagia em placentas infectadas por Zika vírus foi investigado. Uma sequela clássica associada à infecção congênita por este vírus é a ocorrência de microcefalia da criança. A inibição da autofagia *in vitro* em células placentárias humanas levou a uma redução da carga viral, enquanto a indução favoreceu a sua proliferação (96). Em murinos, o tratamento com um inibidor farmacológico da via autofágica (hidroxicloroquina) diminuiu a infecção em placentas e cabeças fetais, prevenindo a microcefalia, apontando que a

autofagia na infecção por Zika não era deletéria, mas benéfica a um patógeno transmitido verticalmente (96).

4. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é uma manifestação grave da infecção pelo parasito, tendo prevalência mundial de mais de 200 mil casos por ano. Sabe-se que o parasito é capaz de cruzar barreiras – como a hematoencefálica e a placentária – e causar infecção grave, podendo levar a manifestações neurológicas como esquizofrenia, retardo mental, além de danos oculares, como a retinocoroidite e a cegueira.

O tratamento da toxoplasmose congênita é complexo. Há limitações terapêuticas a depender do trimestre de gestação empregado e, independente do fármaco utilizado, a transmissão vertical do parasito não é extinguida. Portanto, faz-se necessário explorar novas possibilidades terapêuticas. Uma destas possibilidades é a modulação farmacológica da autofagia, tendo sido promissora em modelos animais e *in vitro* de Zika, patógeno capaz de modular a autofagia da célula hospedeira para sua própria sobrevivência. Neste modelo, a transmissão vertical foi abolida a partir de um fármaco com ação na via autofágica, disponível para uso sob prescrição – e aprovado para uso em gestantes nos Estados Unidos e no Brasil.

Os trofoblastos são células-alvo do parasito durante a transmissão congênita, e a autofagia é uma via sabidamente modulada por patógenos neste tecido; logo, modulações farmacológicas pontuais nesta via podem ser promissoras para o aprimoramento de terapias para gestantes. Em contrapartida, modelos *in vitro* de toxoplasmose congênita não são capazes de recapitular aspectos centrais da transmissão vertical e resposta a fármacos. Portanto, faz-se necessário elaborar um modelo robusto utilizando animais a fim de testar novas possibilidades terapêuticas na toxoplasmose congênita.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Estabelecer modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo da toxoplasmose congênita visando analisar o papel da autofagia na infecção de trofoblastos pelo *Toxoplasma gondii*.

Objetivos específicos

1. Padronizar a infecção de trofoblastos da linhagem BeWo por taquizoítos de *T. gondii*;
2. Avaliar a participação da autofagia na infecção de trofoblastos *in vitro*, utilizando-se marcadores contra moléculas da via autofágica e da formação da barreira placentária.
3. Estabelecer um modelo murino de toxoplasmose congênita por meio da infecção de fêmeas grávidas com taquizoítos;
4. Avaliar a histopatologia das placentas após infecção das fêmeas durante a gestação;
5. Avaliar a carga parasitária em amostras de tecidos maternos (baço e placenta) e dos conceptos (cabeça) após infecção materna, por PCR em tempo real.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Experimentação *in vitro*

1.1 Cultura de linhagem de trofoblastos

As células da linhagem BeWo (coriocarcinoma humano, ATCC CCL-98) foram plaqueadas em garrafas de 75cm² e ao atingir confluência média de 70% foram lavadas com PBS a 37°C e dissociadas com solução de Tripsina-EDTA por 5 minutos a 37°C. A seguir, a solução de dissociação foi inativada com o mesmo volume de meio DMEM/F12 completo (suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de Penicilina-Estreptomicina). A suspensão obtida foi centrifugada a 1.300 rpm (200x *g*) por 5 minutos para retirada da solução de dissociação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em meio completo. Uma alíquota dessa suspensão foi diluída em Azul de Tripán e observada no hemocítômetro para avaliação da integridade, viabilidade celular e quantificação. Parte da cultura foi replaqueada em garrafas de 75cm² previamente tratadas por 30 minutos com gelatina de porco a 0,2%. A outra parte da suspensão celular foi plaqueada sobre lamínulas de vidro de 13 mm igualmente tratadas com gelatina, por 24h, para realização dos ensaios.

1.2 Obtenção de taquizoítos

Utilizamos taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 obtidos a partir do cultivo em monocamadas de células Vero (epitélio renal de macaco verde africano, ATCC CCL-81). Garrafas com células Vero com cerca de 80% de confluência foram infectadas com taquizoítos. Após quatro ou cinco dias estas células começam a sofrer ciclo lítico e a liberar os taquizoítos no sobrenadante. Já os taquizoítos da cepa RH foram obtidos após lavado peritoneal de camundongos. Uma semana após o inóculo, os animais foram eutanasiados e a seguir aspiramos todo o volume da cavidade peritoneal destes. Para isolamento de parasitos, tanto o sobrenadante das culturas de ME49 quanto o lavado peritoneal foram centrifugados a 1.300 rpm (200 × *g*) por 5 minutos. A seguir, transferimos o sobrenadante com os parasitos para outro tubo, descartando o *pellet*

contendo células, e centrifugamos a 3.000 rpm (1500 × g) por 10 min. A seguir, o *pellet* foi ressuspenso e os parasitos foram contados em hemocitômetro.

1.3 Infecção da linhagem de trofoblastos

Em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, plaqueamos 50 mil trofoblastos da linhagem BeWo por 24h. Ao final, estas culturas foram lavadas 2 vezes com meio simples e mantidas com 400 µL de meio completo até a infecção experimental. Para determinação do índice de infecção, as culturas receberam uma suspensão contendo os parasitos da cepa RH na proporção 1:1 ou 3:1 (parasito:célula). Parte dos poços permaneceu infectada durante 24h, enquanto a outra parte foi infectada por 3h, lavada e incubada até 24h. Ao final deste tempo, todas as culturas foram gentilmente lavadas com meio simples e com PBS a 37°C e fixadas com Bouin.

Após fixação por 1 hora, os poços foram lavados com álcool 70%. A seguir, o corante de Giemsa previamente filtrado foi adicionado aos poços por 1h, com homogeneização periódica a cada 15 minutos. Ao final do tempo de incubação com o corante, as lamínulas foram lavadas, montadas em 10 µL de Permunt em lâminas e observadas no microscópio óptico para determinação do índice de infecção.

A fim de avaliar o melhor MOI (multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*) e tempo de infecção, fizemos a análise do Índice de Infecção das culturas após interação. Esta análise foi performada com o método de simples cego para reduzir o viés de contagem. Foram analisadas 3 lamínulas de cada condição experimental e em cada lamínula foram avaliadas ao menos 200 células. Para cada célula era reportado o número de parasitos observado ou ausência de infecção. As células presentes nas bordas das lamínulas foram desprezadas na contagem. Ao final da contagem, aplicamos as seguintes fórmulas, previamente descritas (97):

- a. Porcentagem de células infectadas

$$\frac{(\text{Número de células infectadas} * 100)}{n^{\circ} \text{ total de células}}$$

- b. Índice de infecção

$$\frac{(\% \text{ células infectadas} * \text{parasitos intracelulares})}{n^{\circ} \text{ total de células}}$$

1.4 Análise por microscopia de fluorescência

Foram plaqueadas 150 mil células BeWo sobre lamínulas previamente revestidas com 0,2% de gelatina de porco, por 48h. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítos da cepa ME49 no MOI 3:1 (parasito:célula) por 3 ou 24h. Ao final destes tempos, os poços infectados foram lavados com PBS e fixados com 500µL de paraformaldeído 4%, temperatura ambiente, por 30 minutos. As lamínulas foram, então, incubadas com o anticorpo primário contra LC3b produzido em coelho (Sigma-Aldrich, L7543, concentração final 10 µg/ml), contra ZO-1 produzido em camundongo (ThermoFisher, TL277395, concentração final de 2,5 µg/ml) e contra *T. gondii* produzido em coelho (BioRad, 90700556, concentração final 20 µg/ml) ou camundongo (ThermoFisher, MA183499, concentração final de 1,25 µg/ml). Todas as incubações foram realizadas *overnight* em câmara úmida à 4°C. Após período de incubação, as lamínulas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários contra coelho ou camundongo, produzidos em cabra, acoplados aos fluorocromos AlexaFluor 488 ou 594 (ThermoFisher, concentração final 1,3 µg/mL). A montagem das lamínulas foi realizada em Prolong Gold contendo DAPI.

Para marcação de vacúolos autofágicos utilizamos, também, o traçador monodansilcadaverina (MDC). MDC é um composto com afinidade a compartimentos acídicos, como lisossomos e autofagossomos tardios, e a marcação destes compartimentos é aumentada durante a autofagia (92). Para os ensaios com MDC (Sigma Aldrich 30432, concentração final de 100 µM), as células BeWo foram plaqueadas em

placas de 24 poços com lamínulas na densidade de 50 mil células/poço. Após 24h, as células foram lavadas com PBS e infectadas com taquizoítos da cepa ME49 em diferentes momentos, de forma que no momento da fixação das células tivéssemos poços com tempos de infecção variando de 15 min até 6h. Adicionamos MDC aos poços 1h antes do término do experimento. Ao final do tempo de infecção, lavamos os poços 2 vezes com PBS e fixamos as células com paraformaldeído a 4% por 15 minutos. Após esse tempo, lavamos com PBS e montamos as lamínulas em DABCO.

As células foram fotografadas no microscópio Zeiss Apotome. Foram feitas duas análises: a primeira, de determinação da área da célula/sincício, avaliado a partir das imagens de contraste diferencial interferencial (DIC). A segunda foi a determinação da área ocupada por vacúolos autofágicos nestas células.

1.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

Para caracterizar a autofagia a nível ultraestrutural, 150 mil células da linhagem BeWo foram plaqueadas e infectadas por 24h no MOI 10:1 com a cepa RH. Ao final do tempo de infecção, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas por 1h em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, lavadas no mesmo tampão e armazenadas a 4°C. O material foi pós-fixado por 1h em tetróxido de ósmio 1% com ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM, diluídos em tampão cacodilato de sódio. A seguir, o material foi lavado no mesmo tampão e desidratado em soluções crescentes de acetona (30%, 50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos em cada etapa, sendo a última repetida três vezes. O material foi compactado por centrifugação e infiltrado com resina (Epon) diluída 1:1 com acetona 100%. No dia seguinte, o material foi infiltrado com a resina pura, onde permaneceu de 4 a 6 horas em temperatura ambiente e overnight a 4°C. Em seguida, o material foi emblocado e incluído em moldes de silicone e incubado em estufa a 60°C por 72h. Os blocos de células foram cortados em ultramicrótomo, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados no microscópio de transmissão Jeol 1011 localizado na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth do Pavilhão Carlos Chagas/IOC.

2. Experimentação *in vivo*

2.1 Aspectos éticos

Os animais utilizados neste estudo foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz) a partir da licença CEUA IOC 042/2018, e mantidos no biotério de experimentação animal do Pavilhão Carlos Chagas, com ciclos de luz de 12/12h, comida e água *ad libitum*.

2.2 Estabelecimento do modelo de toxoplasmose congênita

Uma semana após a chegada ao biotério de experimentação, os animais das linhagens Swiss e BALB/c foram pareados na proporção de duas fêmeas por macho. No dia seguinte, após a pesagem, as fêmeas foram avaliadas quanto à presença de plugue vaginal, indicativo de coito. Caso a fêmea apresentasse o plugue vaginal, consideramo-la como grávida no dia embrionário 0.5 (E0.5). No oitavo dia pós-deteção de plug (E8.5), quando há o afundamento da placa neural e, portanto, a infecção poderia causar danos ao sistema nervoso central em formação, as fêmeas receberam uma suspensão endovenosa de 100 µL contendo 10^5 , 10^6 ou 10^7 taquizoítos da cepa ME49. O grupo controle recebeu inóculo de solução salina estéril (PBS). No dia embrionário E13.5/14.5 (5 dias após a infecção), as fêmeas grávidas foram eutanasiadas e seus órgãos (baço, fígado, cérebro e placenta) e embriões foram coletados. As fêmeas foram pesadas diariamente desde o primeiro dia de acasalamento até o dia da eutanásia. As unidades placenta-embrião foram fotografadas para morfometria e os baços maternos foram pesados e fotografados. Após registro morfométrico e pesagem, parte destes tecidos maternos e fetais foi fixada para processamento histológico e a outra parte congelada a -80°C para a reação de PCR quantitativo.

2.3 Avaliação morfométrica

A área da caixa craniana dos conceptos foi medida a partir do comprimento da coroa (centro da cabeça) ao cóccix (fim da coluna vertebral) e do diâmetro frontal-occipital (CR x OF) (96). A área da placenta foi obtida a partir da média de duas aferições (uma vertical e outra horizontal) do diâmetro da placenta, para o cálculo do raio. Estas medições foram realizadas no software de edição de imagens Adobe Photoshop CS6.

2.4 Análises histopatológicas

Realizada segundo protocolo padrão de histologia (98). Brevemente, após eutanásia das fêmeas grávidas da linhagem BALB/c infectadas com ME49, as placentas foram lavadas em PBS gelado, fixadas por 48h em formalina tamponada de Carson, clivadas e processados segundo protocolo padrão de inclusão em parafina, que inclui desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (1h em cada concentração: 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, sendo esta última etapa repetida 3 vezes). Depois, procedemos à clarificação por xilol em dois banhos de 1h cada. Por fim, realizamos a infiltração do tecido em parafina líquida em duas etapas, uma em 1h e outra em 2h. Os cortes (5 µm de espessura) foram processados para coloração de hematoxilina-eosina e as lâminas foram escaneadas em microscópio de luz.

3. Determinação da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR).

3.1 Elaboração da curvas-padrão

As amostras de tecidos (cérebro, fígado, baço, placenta e cabeça fetal) de animais não infectados foram fracionadas, pesadas, contaminadas artificialmente com 10^6 taquizoítos e lisadas com *TissueRuptor* (Qiagen) em PBS contendo proteinase K, sendo mantidas por 1h a 56°C. O DNA foi extraído com o kit de extração *High Pure PCR*

Template Preparation kit (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Ciclo de reação: 95 °C – 10' / 95 °C – 15" x 40, temperatura de anelamento de 64°C por 1 minuto. O DNA foi dosado por espectrofotometria (Nanodrop) e diluído para estabelecimento dos pontos da curva padrão. Para a detecção do *T. gondii* nos tecidos, amplificamos o fragmento de 81-bp do elemento de repetição (RE) 529-bp do genoma do protozoário (99), e para controle endógeno amplificamos β -actina.

Tabela 1 – Alvos contemplados neste estudo e suas sequências de *primers*.

Alvo	Sequência de <i>primers</i>	Referência
β -actina	Fw (5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3')	(100)
	Rv (5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3')	
Toxo_RE	Fw (5'-CACAGAAGGGACAGAAGTCGA-3')	(99)
	Rv (5'-CAGTCCTGATATCTCTCCTCCAAGA-3')	

3.2 Determinação da carga parasitária

Os tecidos maternos (placenta, baço e fígado) e fetais (cabeça) da linhagem Swiss Webster foram fracionados na ocasião da coleta dos tecidos e o protocolo foi adaptado em relação ao protocolo de elaboração da curva padrão: para determinar a carga parasitária, aos fragmentos de tecido foi acrescido o dobro de volume de tampão de lise (volume final: 400 μ L) do kit anteriormente mencionado (item 3.1). Em seguida, foram lisados com o *Tissue Ruptor*, tratados com Proteinase K por 1h a 56°C. Ao final da incubação, o DNA obtido foi acoplado a uma coluna e tratado com as soluções incluídas no kit de extração. Ao final, o volume de DNA obtido foi armazenado a -20°C até a análise. Após extração, parte do volume dos DNAs foi diluído em água livre de DNase, seriadamente, em 10 e 100x. Na placa de qPCR, o volume final por poço foi de 20 μ L,

onde deste total 2 μ L eram de DNA e 18 μ L de *Mastermix* contendo água, *primers* e *SYBR Green* (Thermo Fisher, A46109).

4. Análise estatística

Para os ensaios *in vitro*, todos os dados numéricos obtidos estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (SEM). Para as análises morfométricas *in vivo*, foi utilizado o teste de Mann-Whitney a partir de pelo menos três experimentos independentes, com nível de significância considerado de $p \leq 0.05$, ou One-way ANOVA com teste múltiplo de comparação Sidak, com nível de significância considerado de $p < 0.05$ ou $p < 0.01$. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

IV RESULTADOS

4.1 *In vitro*

4.1.1 Determinação do índice de infecção de culturas

Sabendo que o *T. gondii* é capaz de infectar diferentes subpopulações de trofoblastos, buscamos caracterizar a infecção de culturas BeWo com taquizoítos da cepa RH em dois diferentes MOI (1:1 ou 3:1) e tempos (3h ou 24h).

A análise de índice de infecção revelou que, embora o número de parasitos por célula seja maior em 3h, independente do MOI (Figura 4.1A), a porcentagem de células infectadas e o índice de infecção geral das culturas foi maior no MOI de 3:1, 24h (Figura 4.1B, C). A partir destes resultados, fizemos a análise de detecção de vacúolos autofágicos por MDC.

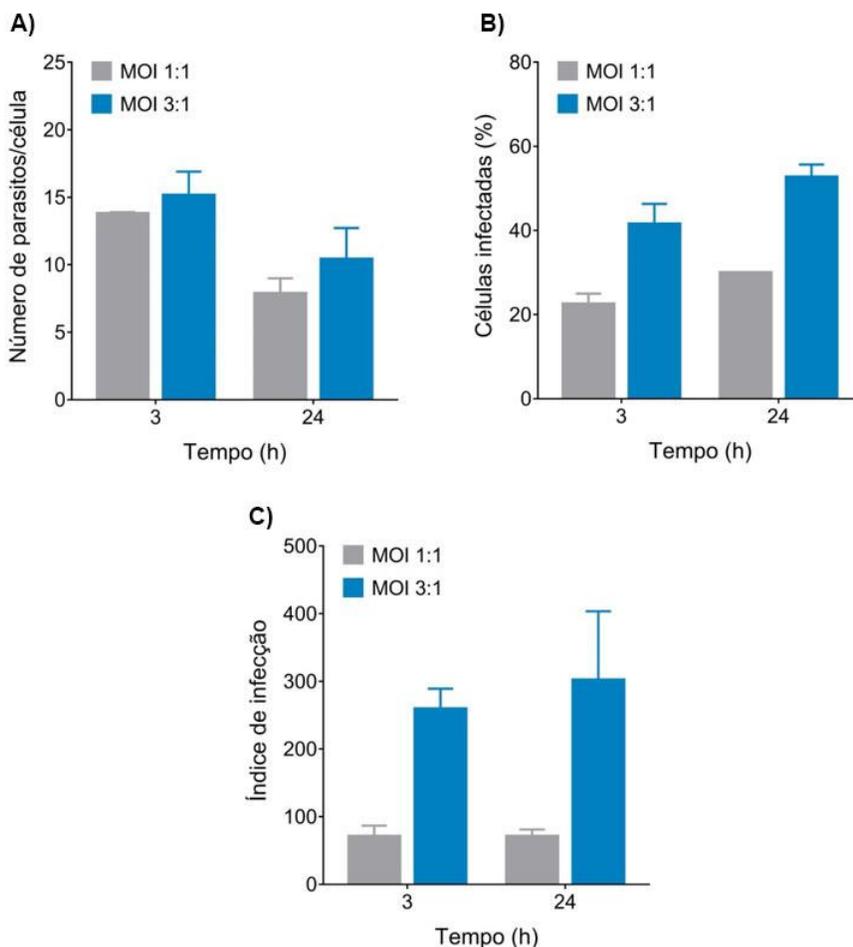


Figura 4.1. Caracterização da infecção por *Toxoplasma gondii* em culturas de trofoblastos da linhagem BeWo. Foram plaqueadas 50 mil células e infectadas com taquizoítos da cepa RH, nos MOI 1:1 ou 3:1 (parasito:célula) por 3 ou 24h. **A:** Número de parasitos por célula. **B:** Percentual de células infectadas. **C:** Índice de infecção. n=2-3. Média ± SEM.

4.1.2 Rastreamento de autofagia por MDC

A fim de avaliar qual o período mais favorável para observação da autofagia nas células trofoblásticas, fizemos a marcação das culturas com MDC. Foi no tempo de 3h de infecção que havia mais área de marcação por MDC nos grupos de trofoblastos fotografados (Figura 4.2A, B). Este resultado parece ser tempo-dependente, uma vez

que a porcentagem diminui desde 6h até 24h – o último tempo analisado (Figura 4B). Do mesmo modo, o número de vacúolos por campo é maior com 3h e tende a diminuir ao longo do tempo.

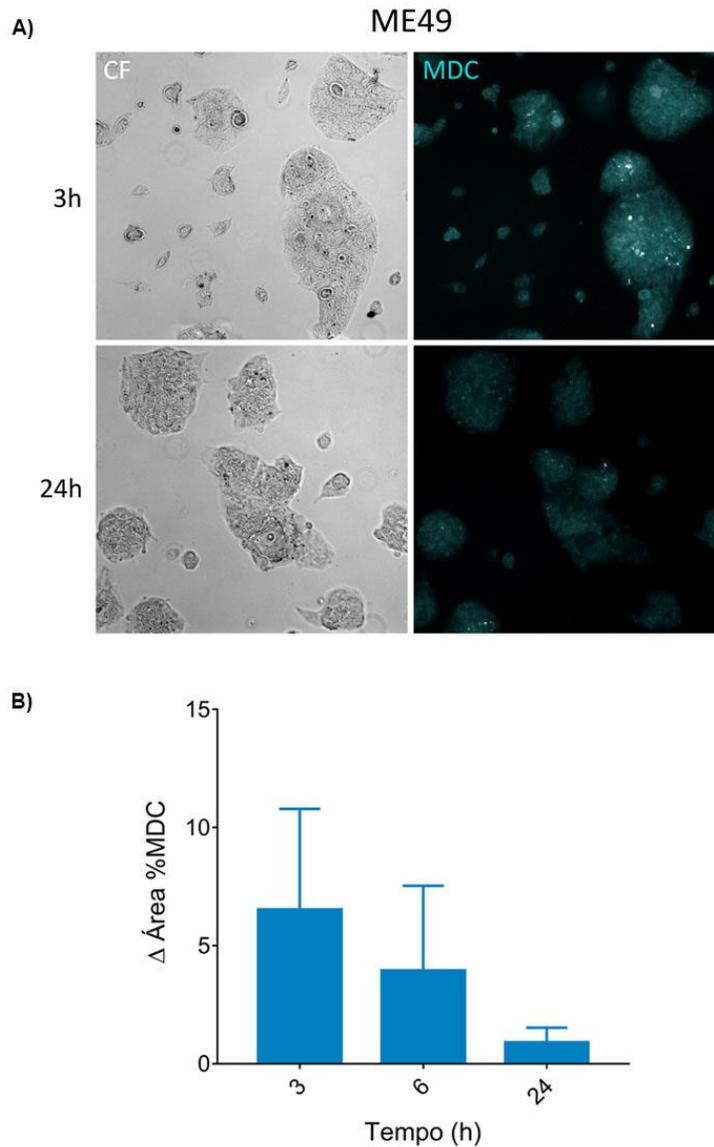


Figura 4.2. Rastreamento de autofagossomos com MDC. As culturas de BeWo foram infectadas com taquizoítos da cepa ME49 nos MOI 1:1 ou 3:1 por 3, 6 ou 24h. Uma hora antes do fim da infecção, foram adicionados 100 μ M de MDC aos poços. **A:** Imagem representativa do tempo inicial (3h) e final (24h). Os vacúolos autofágicos são

vistos arredondados e brilhantes. **B:** Variação do percentual da área ocupada por vacúolos marcados com MDC em relação ao grupo controle. CF: Contraste de fase. n=2. Média \pm SEM.

4.1.3 Análise de autofagia por LC3b

Após o rastreamento de autofagossomos com MDC, avaliamos a autofagia da célula hospedeira a partir da imunomarcagem contra a proteína LC3b. Para esta análise, utilizamos a cepa ME49 e os dois extremos de período de infecção do experimento com MDC (3 e 24h) e o MOI estabelecido a partir do índice de infecção (3:1). A infecção levou ao aparecimento de *puncta* de LC3 nas células e também nos parasitos, sendo em 24h observados pontos de sobreposição dos canais (parasito + LC3) (Figura 4.3).

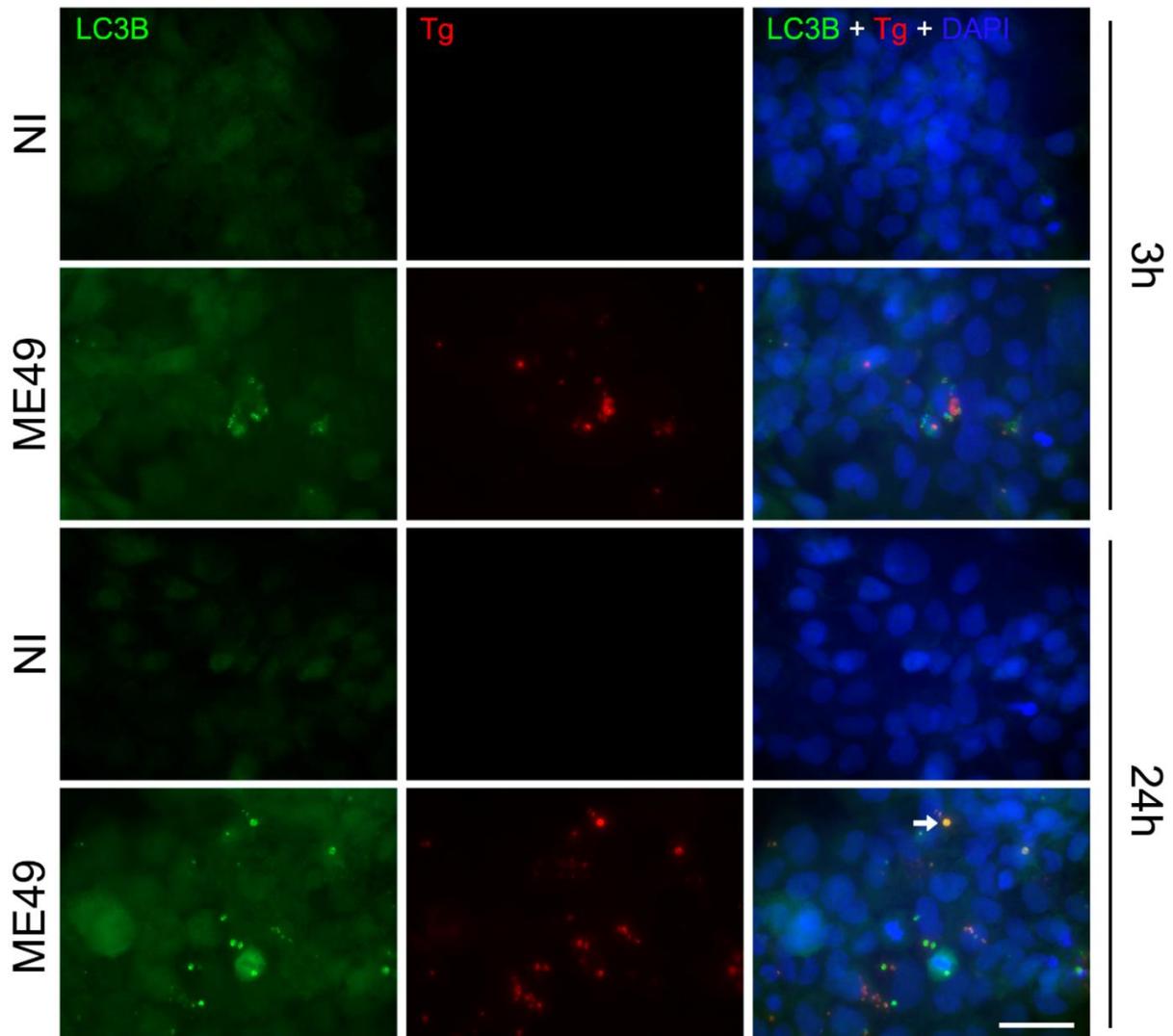


Figura 4.3. Avaliação qualitativa da autofagia por LC3b. As culturas de BeWo foram infectadas por taquizoítos de ME49 de 3 a 24h no MOI 3:1, em quadruplicata. A imunomarcção contra LC3b revela *puncta* da proteína nas células hospedeiras. Em alguns pontos, há a sobreposição desta com a marcação contra o parasito. Barra de escala: 50 μ m. n=2. Seta: sobreposição das marcações. NI = Não infectado. Tg: *Toxoplasma gondii*.

Com a ampliação dos campos observados, é possível verificar a presença de LC3 em concomitância com a marcação contra o parasito, sobretudo no maior tempo de infecção (Figura 4.3.1).

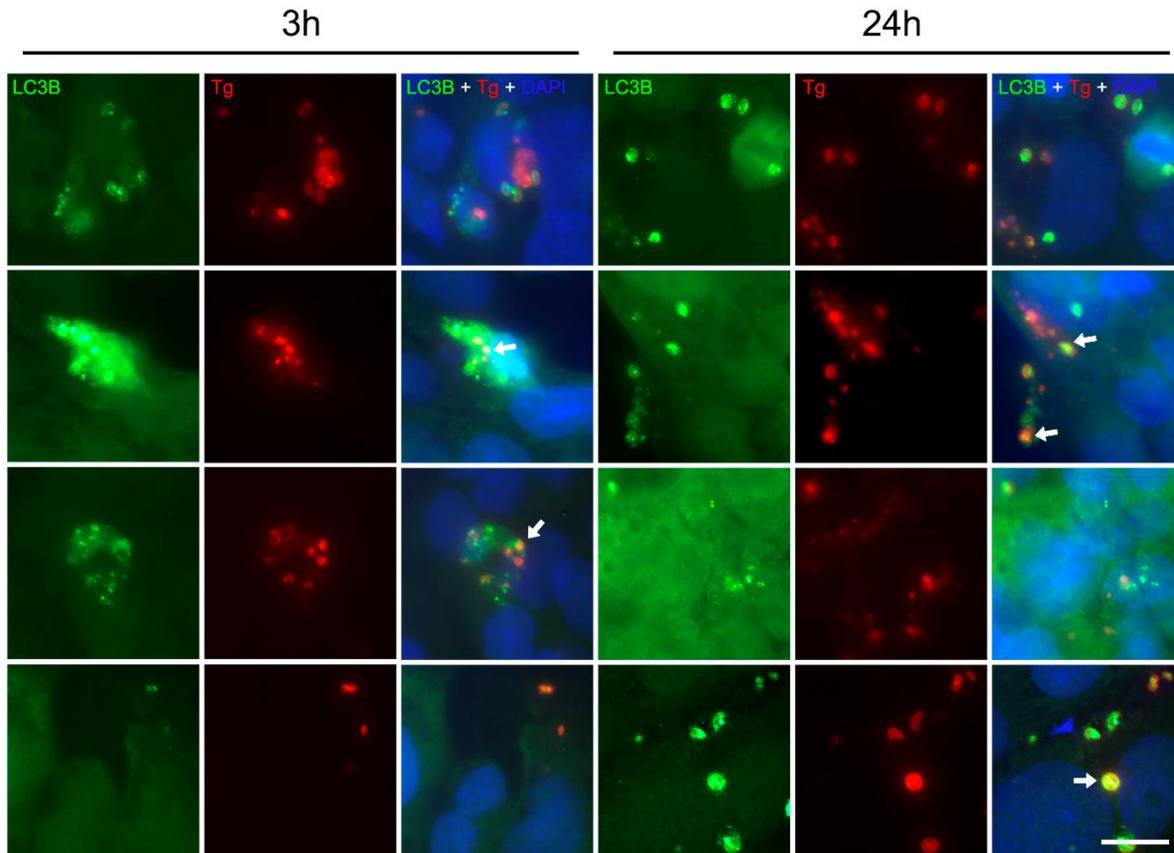


Figura 4.3.1. Detalhe da imunomarcção contra LC3B em culturas infectadas. Ampliações dos campos da Figura 4.3 com maior densidade de infecção e de *puncta* de LC3b. Barra de escala: 20 μm . Seta branca: sobreposição das marcações. n=2. Tg: *Toxoplasma gondii*.

4.1.4 Avaliação da integridade de barreiras

Sabendo que o *T. gondii* é capaz de cruzar a barreira placentária e estabelecer infecção *in vitro*, nos questionamos como estaria a integridade da barreira formada por trofoblastos BeWo uma vez que esta fosse infectada com taquizoítos. Para isto, fizemos a infecção das culturas por 3 ou 24h e ao final, performamos a imunomarcção para ZO-1 (Figura 4.4). A análise qualitativa das imagens sugere que, na presença dos parasitos, há menor intensidade da imunomarcção contra esta proteína (Figura 4.4.1), sugerindo que a infecção perturba a integridade da barreira placentária.

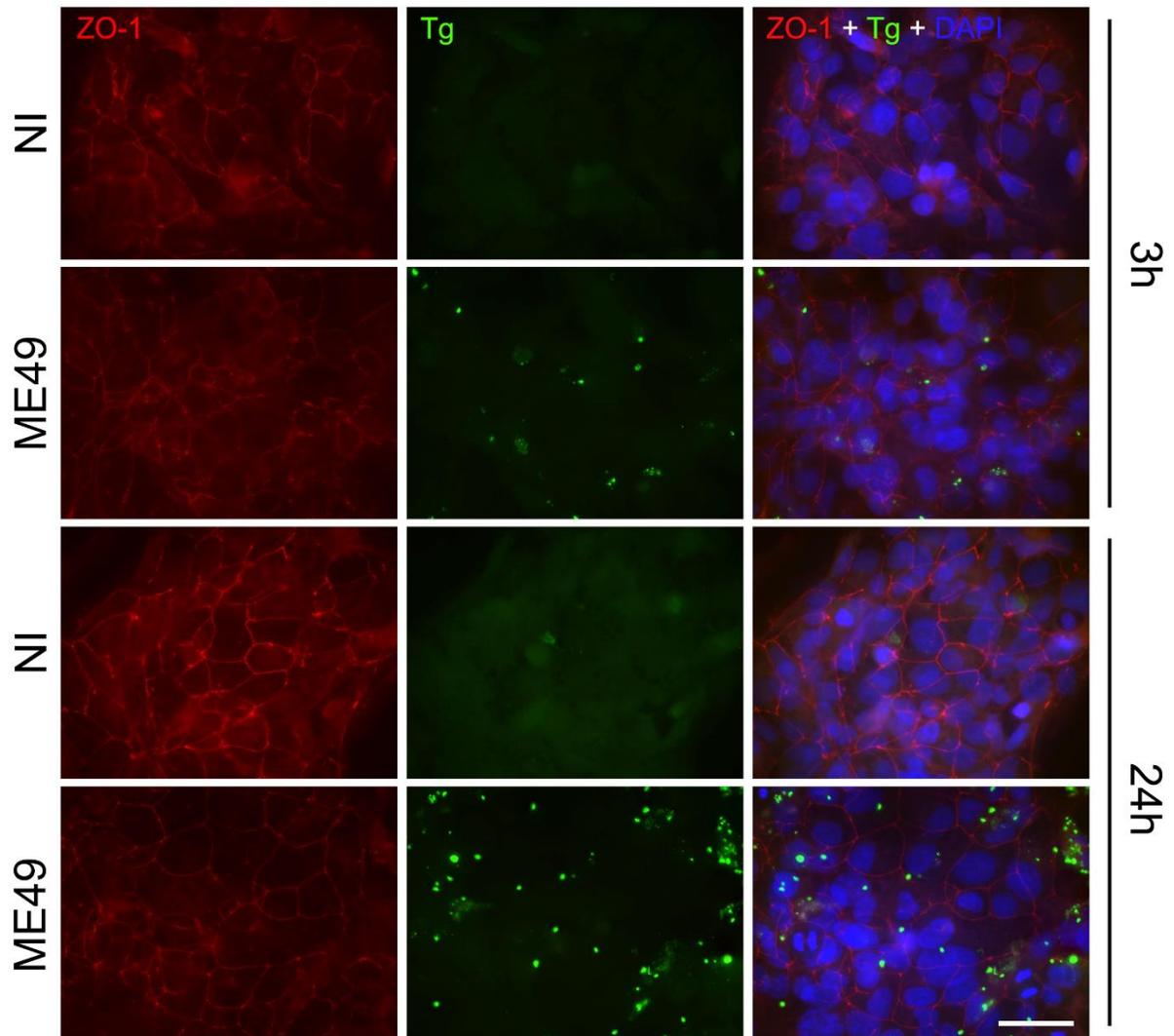


Figura 4.4. Integridade de barreira placentária. As culturas de BeWo foram infectadas com taquizoítos de ME49 por 3 ou 24h no MOI 3:1 e incubadas com anticorpo primário contra *T. gondii* ou ZO-1, proteína essencial para a polaridade de células placentárias. Barra de escala: 50 μ m. n=2. NI = Não infectado.

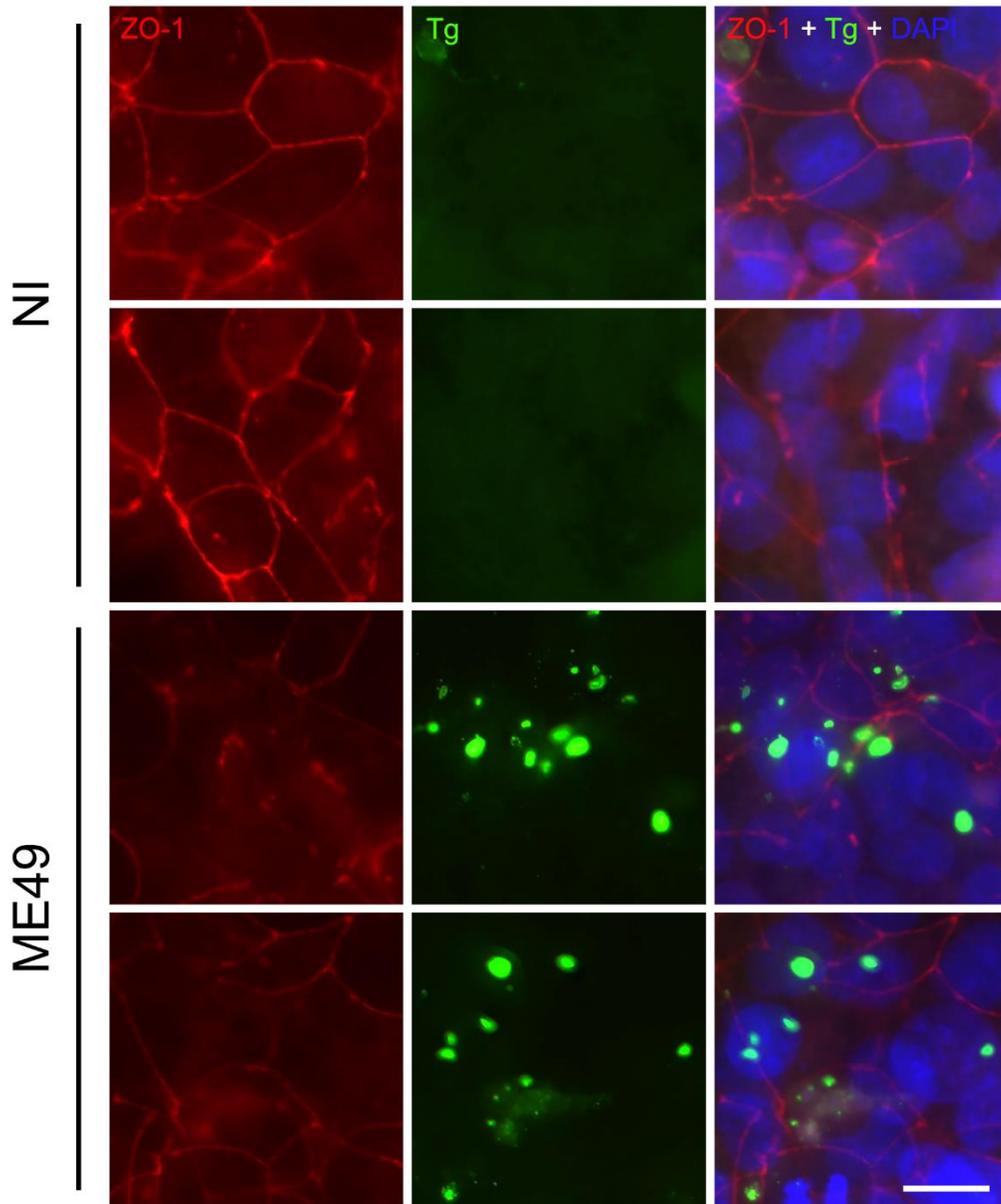


Figura 4.4.1. Detalhe da análise de integridade de barreira placentária. Ampliações dos campos da Figura 4.4. Nos campos com maior densidade de infecção, vemos uma menor intensidade da marcação contra ZO-1. Barra de escala: 20 μ m. n=2. NI = Não infectado.

4.1.5 Caracterização ultraestrutural

Após investigar o fluxo autofágico por microscopia de luz, buscamos fazer uma caracterização a nível ultraestrutural da autofagia da célula hospedeira. Para esta caracterização, infectamos as culturas com taquizoítos da cepa RH por 24h. Nas culturas não infectadas, observamos as junções célula-célula e vilosidades de membrana, típicas da linhagem BeWo (Figura 4.5). Já nas culturas infectadas, observamos a desestabilização da membrana do vacúolo parasitóforo (Figura 4.6C e D), além de vacúolos de membrana dupla e eletrondensa sugestivos de autofagia. Nestes vacúolos há, entre outros materiais, um parasito sendo degradado (Figura 4.7). Ainda, nas culturas infectadas observamos muitos campos com perfis de retículo englobando mitocôndrias, além de proximidade com o Golgi da célula (Figura 4.8).

Juntos, os nossos resultados *in vitro* sugerem que a infecção em trofoblastos leva ao aumento da autofagia da célula hospedeira e à perturbação da integridade de barreira placentária.

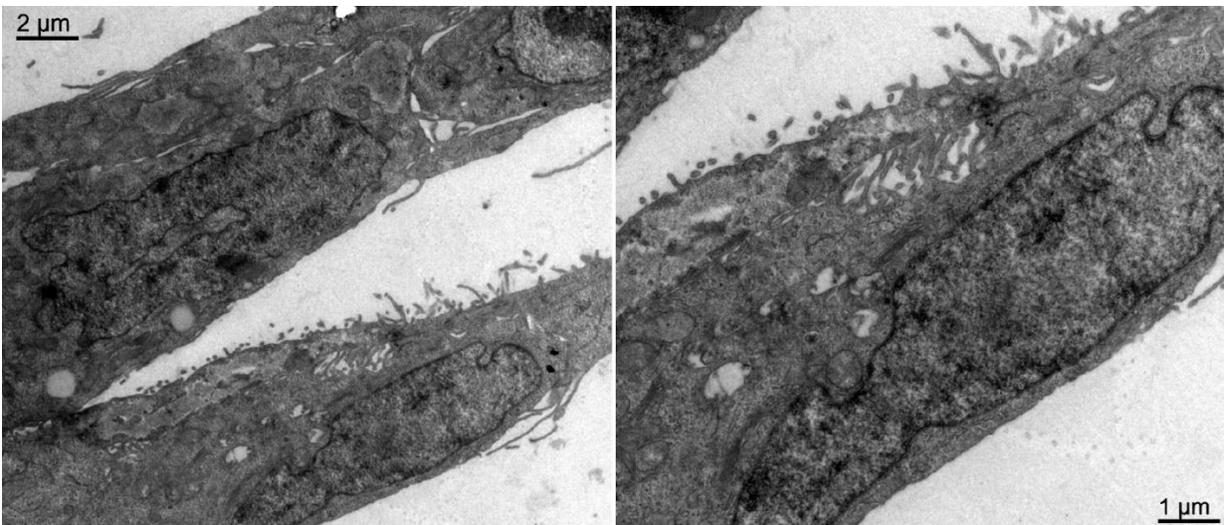


Figura 4.5. Caracterização ultraestrutural de BeWo não infectada. As células foram plaqueadas. Após 24h, foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. As células não infectadas apresentam as junções célula-célula e vilosidades de membrana típicas da linhagem.

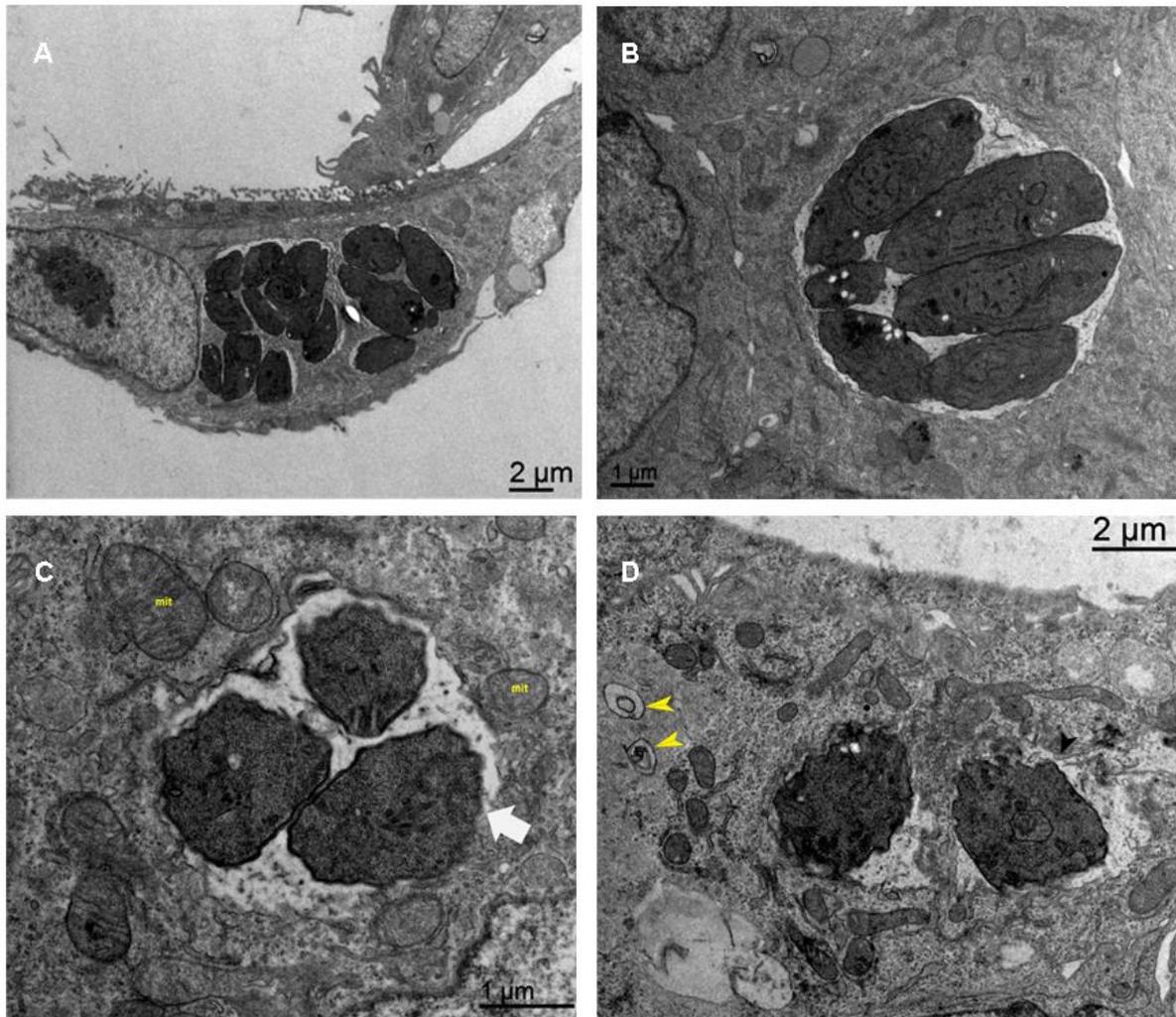


Figura 4.6. Caracterização ultraestrutural de BeWo infectada por *T. gondii*. As culturas foram infectadas com taquizoítos da cepa RH, por 24h, no MOI 10:1. O material foi processado para microscopia eletrônica de transmissão. Observamos a distribuição dos parasitos em vacúolos parasitóforos nas células (A e B). C: Desestabilização da membrana do vacúolo parasitóforo (seta branca). D: Presença de estruturas sugestivas de autofagia (cabeça de seta). Mit: mitocôndria.

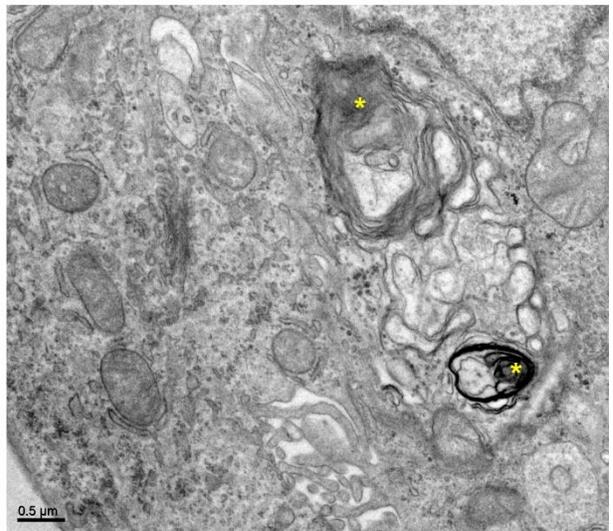
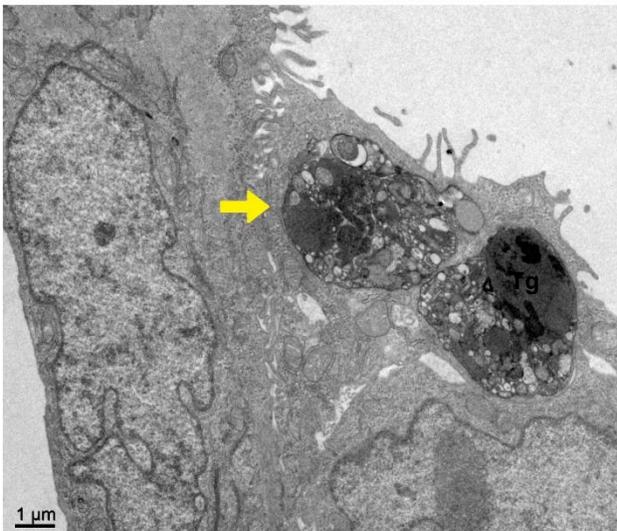
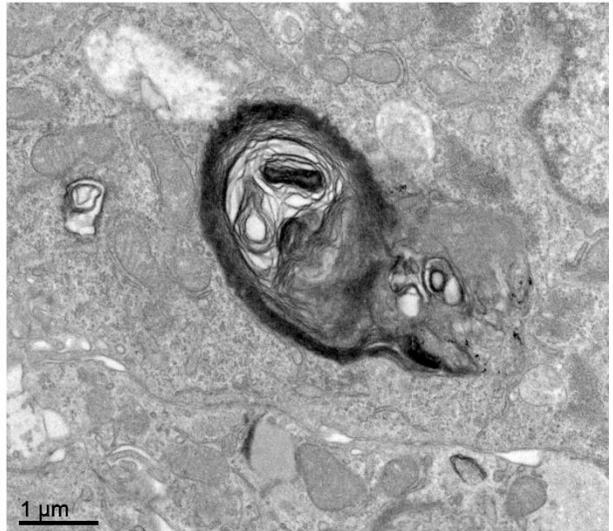
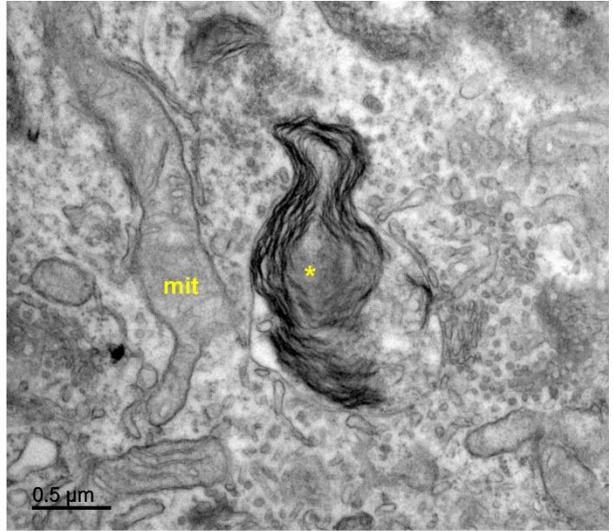
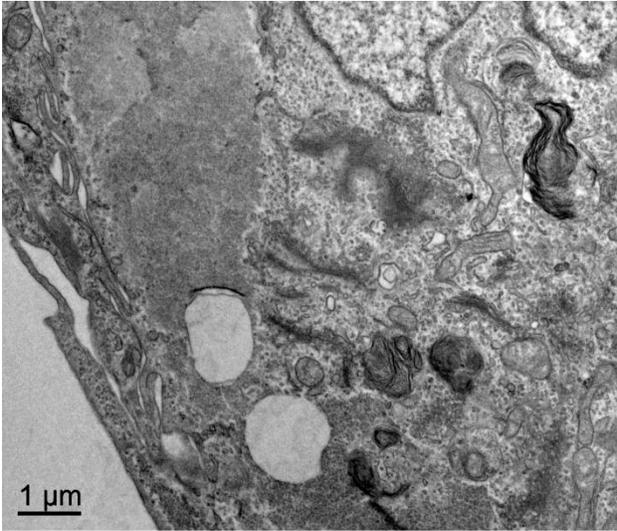
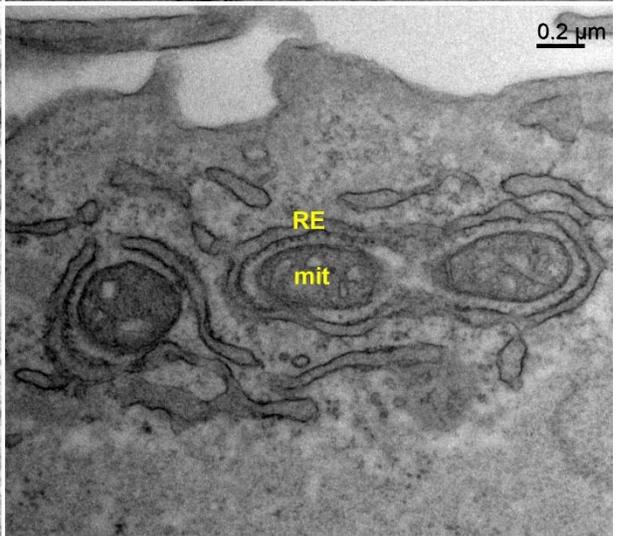
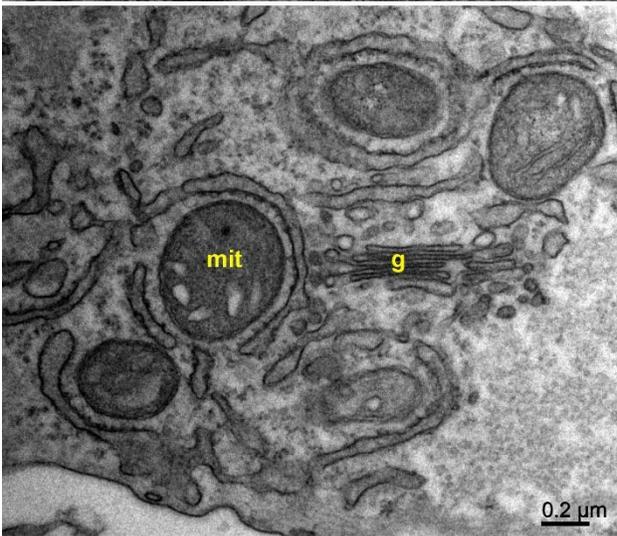
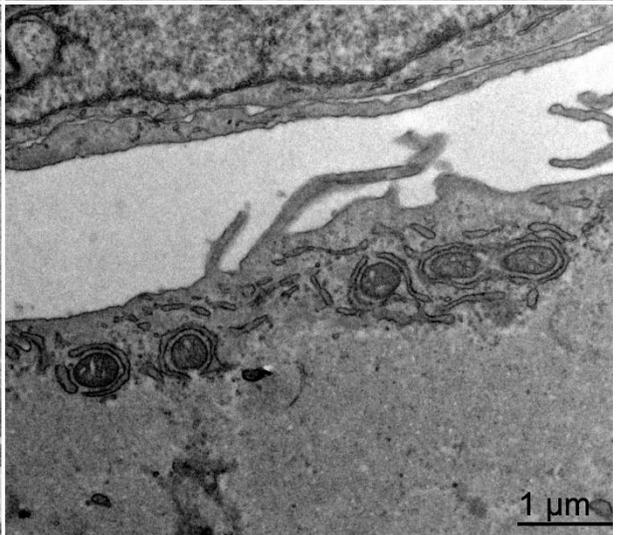
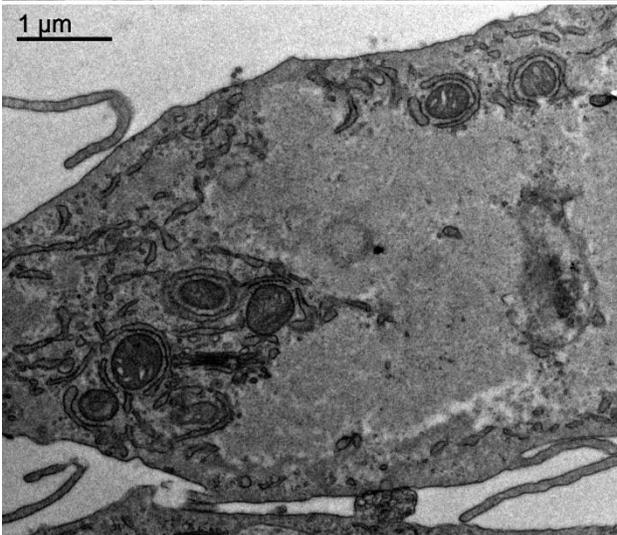
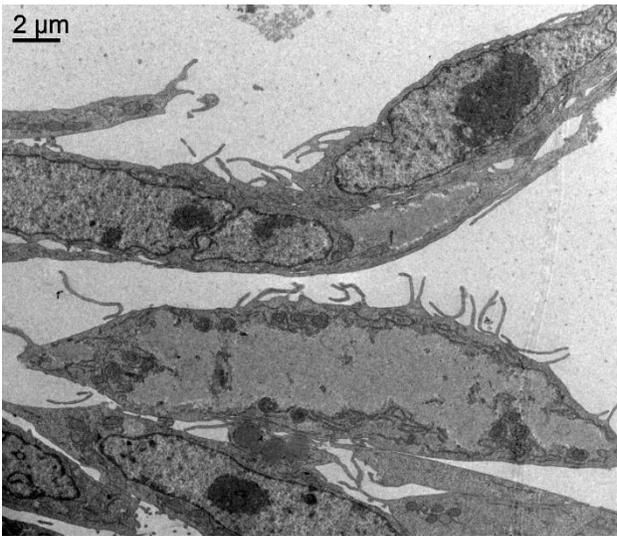


Figura 4.7. Detecção de estruturas sugestivas de autofagia. Nas culturas infectadas, é possível ver estruturas compostas por múltiplas membranas celulares (* corpos multilamelares), além de um processo de degradação intravacuolar (seta) de materiais diversos, incluindo um parasito (Tg). Mit: mitocôndria.



4.8. Índícios de mitofagia nas culturas. As culturas infectadas apresentaram diversos perfis de retículo envolvendo mitocôndrias, em proximidade com o Golgi da célula hospedeira. G: complexo de Golgi. Mit: mitocôndria. RE: retículo endoplasmático.

4.2. *In vivo*

4.2.1 Estabelecimento do modelo murino de toxoplasmose congênita

Para estabelecimento do modelo murino de toxoplasmose congênita, utilizamos duas linhagens de camundongos: Swiss Webster e BALB/c. A partir da visualização do plugue vaginal, as fêmeas foram separadas em uma nova caixa e mantidas por 8 ou 9 dias, quando foram inoculadas com PBS ou infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME49. A fim de decidir o melhor inóculo e linhagem, compilamos alguns parâmetros da gestação (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros avaliados no modelo murino de toxoplasmose congênita.

Linhagem	Inóculo	Fetos por ninhada	Fetos amorfos	Reabsorções	N
Swiss	PBS	8,5 ± 5,2	0	0,5 ± 0,8	6
Webster	10 ⁵	11,5 ± 0,7	0	1,5 ± 2,1	2
	10 ⁶	11,0 ± 5,6	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,6	3
	10 ⁷	8,5 ± 2,1	0,5 ± 0,7	2,0 ± 1,4	2
BALB/c	PBS	4,9 ± 3,1	0,3 ± 0,5	2,0 ± 1,5	7
	10 ⁶	7,5 ± 3,5	0	3,5 ± 3,5	2
	10 ⁷	4,7 ± 4,2	2,0 ± 2,6	2,0 ± 2,0	3

N: número de fêmeas analisadas por inóculo.

As fêmeas da linhagem Swiss Webster apresentaram baixa frequência de falso plugue (plugue vaginal sem gravidez): apenas 25% dos animais infectados com a carga mais alta, de 10⁷ parasitos. Nesta linhagem observa-se maior quantidade de fetos por ninhada e menor frequência de fetos amorfos e reabsorções, de modo geral, em comparação com as fêmeas BALB/c.

Por outro lado, as fêmeas da linhagem BALB/c apresentaram elevadas taxas de falso plugue, tanto nos grupos infectados (71,4% para o inóculo de 10⁶ e 66,7% para o inóculo de 10⁷) quanto no grupo controle (46,2%). Além disso, as fêmeas da linhagem BALB/c que progrediram com a gestação apresentaram, no momento da cesárea, uma média de 4,7 a 7,5 fetos, independente da infecção. A média de fetos amorfos por fêmea nesta linhagem variou de 0 a 2, e de reabsorções de 2 a 3,5, sendo as maiores médias observadas nos grupos infectados. Em todo o experimento, uma única fêmea de BALB/c, inoculada com 10⁷ parasitos, veio à óbito antes do momento da cesárea.

Na ocasião da eutanásia, os úteros foram cuidadosamente retirados da cavidade abdominal das fêmeas, fotografados e dissecados. Ilustrando os achados da Tabela 1, vemos que nas fêmeas infectadas a presença de reabsorções e pontos de hemorragia é frequente, tendo sido mais grave nas fêmeas infectadas com 10^7 parasitos na linhagem Swiss Webster, onde vemos dois cornos uterinos em condições opostas: no corno uterino superior, embriões de tamanho e aspecto saudável; no corno uterino inferior, atrofiado, vemos reabsorções, hemorragias e unidades placenta-embrião hemorrágicas (Figura 4.9).

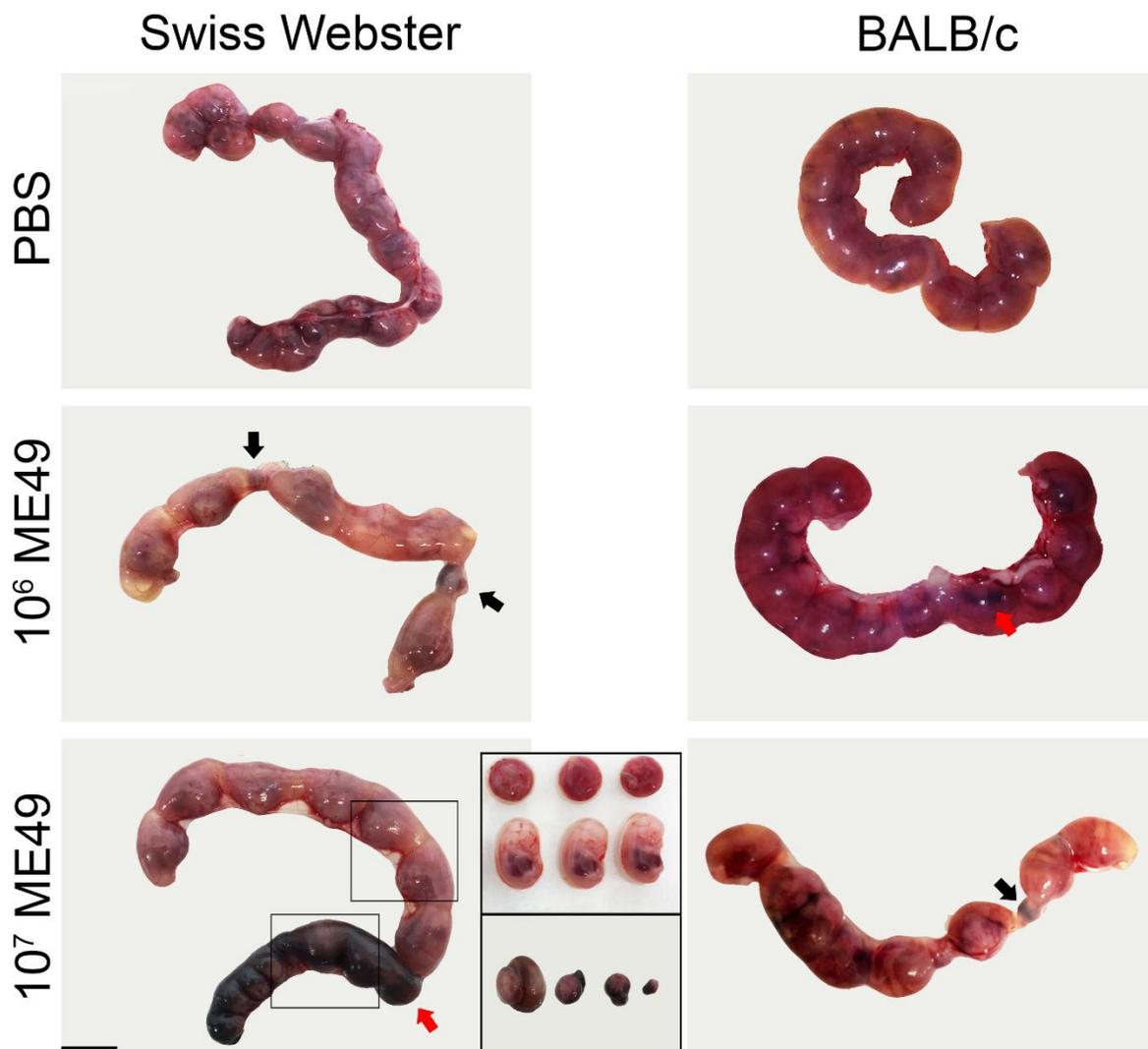


Figura 4.9. Aspectos macroscópicos de úteros de fêmeas das linhagens BALB/c e Swiss Webster. Imagens representativas de pelo menos quatro fêmeas de cada linhagem em cada condição. Nos insertos destacamos o aspecto dos fetos e placentas retirados de uma fêmea de Swiss Webster infectada com 10^7 parasitos. Setas vermelhas: pontos de hemorragia. Setas pretas: reabsorções. Barra de escala: 1 cm.

Um aspecto importante na infecção de camundongos por *T. gondii* é a perda de peso gradativa após a infecção. Por isso, desde o início do acasalamento até o dia da eutanásia, todas as fêmeas foram pesadas diariamente. Em ambas as linhagens de camundongos observamos uma variação positiva desde a data do plugue (E0.5) até a eutanásia (E13.5/14.5) tanto no grupo controle quanto nos grupos infectados com 10^5 ou 10^6 taquizoítos (Figura 4.10). Por outro lado, as fêmeas infectadas com 10^7 parasitos em ambas as linhagens apresentaram, no momento da eutanásia, um ganho de peso menor quando comparadas aos dois grupos supracitados.

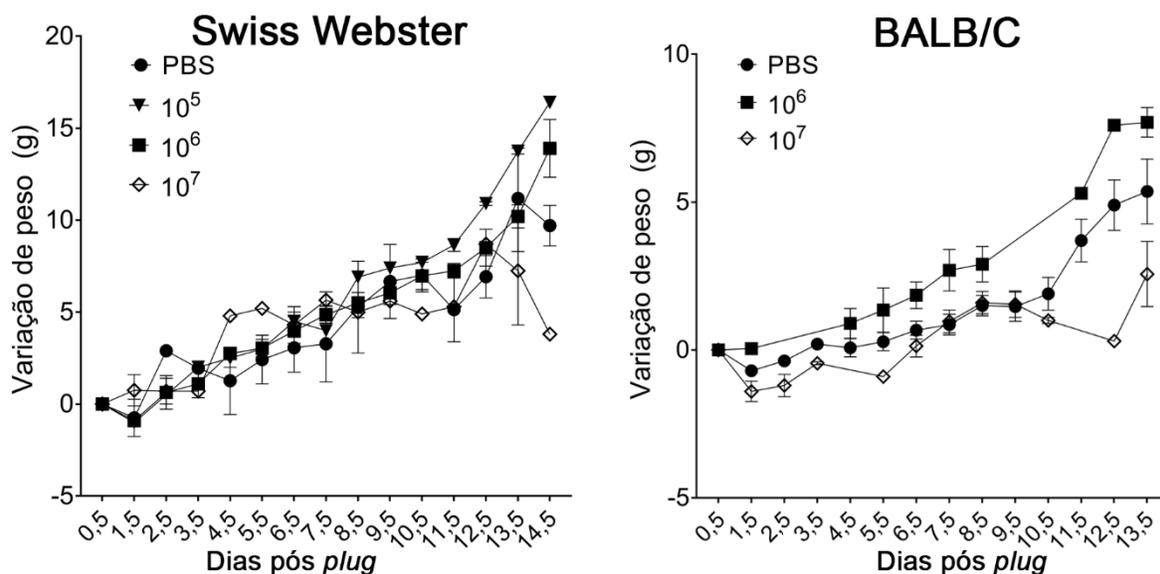
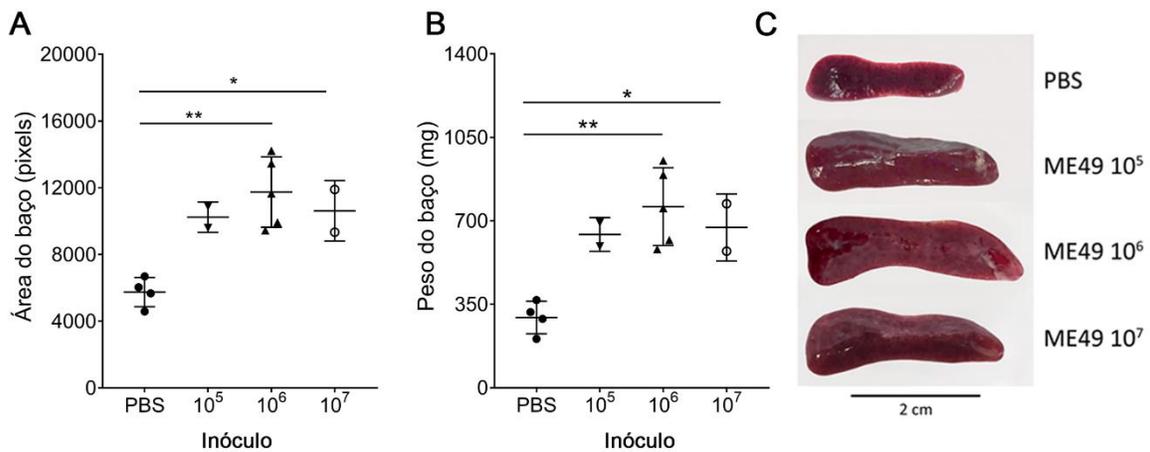


Figura 4.10. Variação de peso de fêmeas. Desde o dia de detecção do plugue vaginal (dia embrionário 0.5) até o dia da eutanásia (dia embrionário 13.5 ou 14.5), todas as fêmeas foram pesadas diariamente. Valores representativos de pelos menos três experimentos independentes (n = 2-7).

A fim de investigar o impacto da infecção nas mães, na ocasião da eutanásia nós pesamos e medimos os baços das fêmeas e posteriormente os fracionamos para diagnóstico molecular. Observamos que as fêmeas infectadas das duas linhagens apresentaram esplenomegalia visível, com peso e área desta víscera significativamente maior em comparação com o baço de fêmeas controle, inoculadas somente com PBS (Figura 4.11).

Swiss Webster



BALB/C

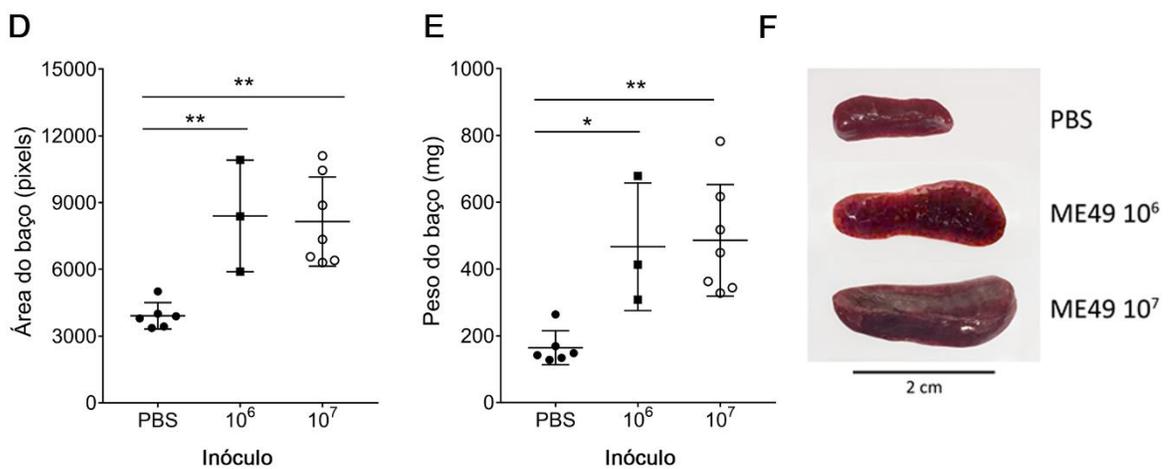


Figura 4.11. Peso e área dos baços de fêmeas. A e D: Valor de área dos baços expresso em pixels. B e E: Peso dos baços, expresso em miligramas. C e F: Imagens representativas de pelo menos duas fêmeas de cada inóculo avaliado. Análise estatística realizada por One-way ANOVA com teste múltiplo de comparação Sidak (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.2.2 Avaliação morfométrica

Uma vez que a toxoplasmose congênita em humanos possa levar a um diâmetro cefálico anormal no conceito, medimos o diâmetro cefálico (frontal-occipital) e o comprimento do embrião (coroa-cóccix) para verificar se estas sequelas se repetiam no nosso modelo. Em fêmeas da linhagem Swiss Webster, a infecção leva a uma alteração no tamanho dos fetos de maneira dependente da carga parasitária do inóculo. Fetos de fêmeas infectadas com 10^5 parasitos são maiores do que o grupo controle, enquanto os fetos de fêmeas que receberam cargas maiores de parasitos (10^6 ou 10^7) apresentam tamanho reduzido em comparação aos demais grupos (Figuras 4.12A e C). Já na linhagem BALB/c não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figuras 4.13A e C).

A fim de avaliar um possível papel protetivo da placenta na infecção, medimos a área deste tecido. As placentas das fêmeas da linhagem Swiss Webster infectadas com 10^7 taquizoítos têm área reduzida em comparação com os demais grupos avaliados (Figuras 4.12B e D). Os animais BALB/c não apresentaram diferença significativa na área das placentas nos grupos observados (Figuras 4.13B e D).

Swiss Webster

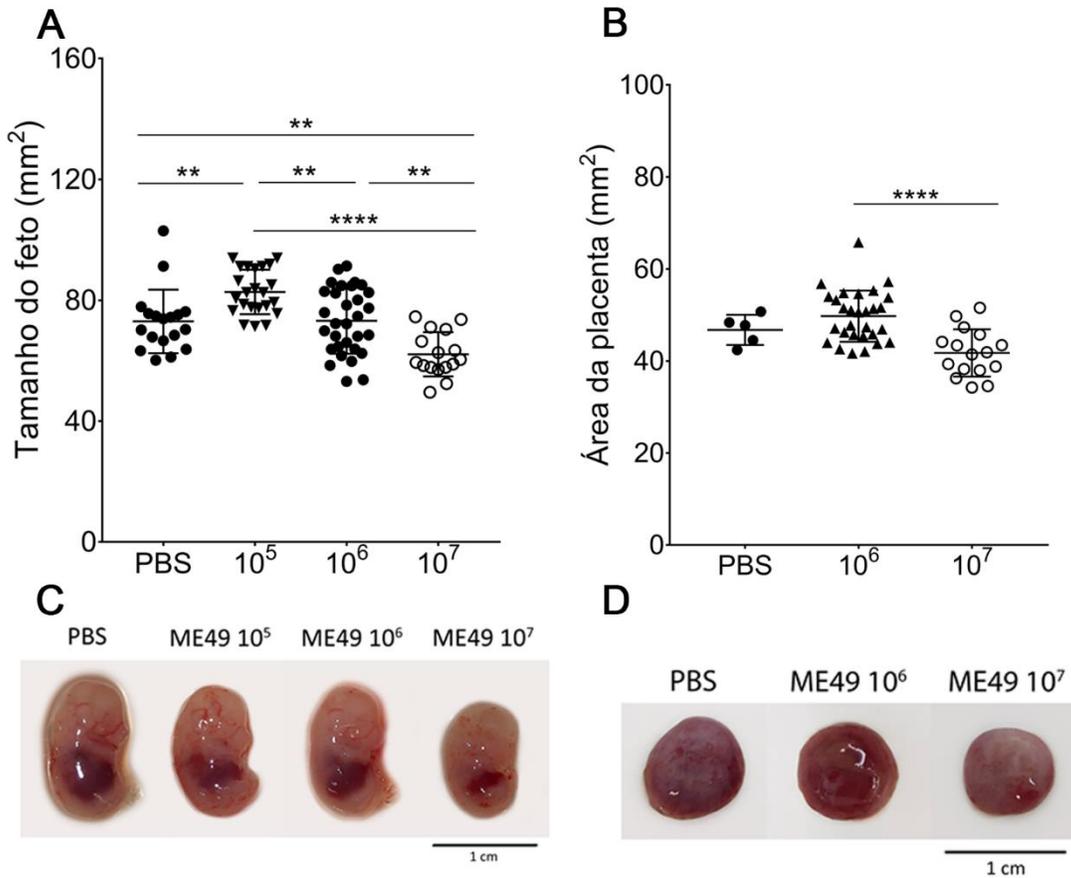


Figura 4.12. Área dos fetos e placentas de animais Swiss Webster. A: Área dos fetos obtidas pelos diâmetros de coroa-cóccix e frontal-occipital e expressas em mm². B: Área das placentas obtidas pela média entre duas medições (horizontal e vertical), seguida de cálculo de raio e área. C e D: Imagens representativas dos experimentos. Foram analisados pelo menos 5 fetos e placentas de 2-4 experimentos independentes. Análise estatística realizada por One-way ANOVA com teste múltiplo de comparação Sidak (** p < 0.01; **** p < 0.0001).

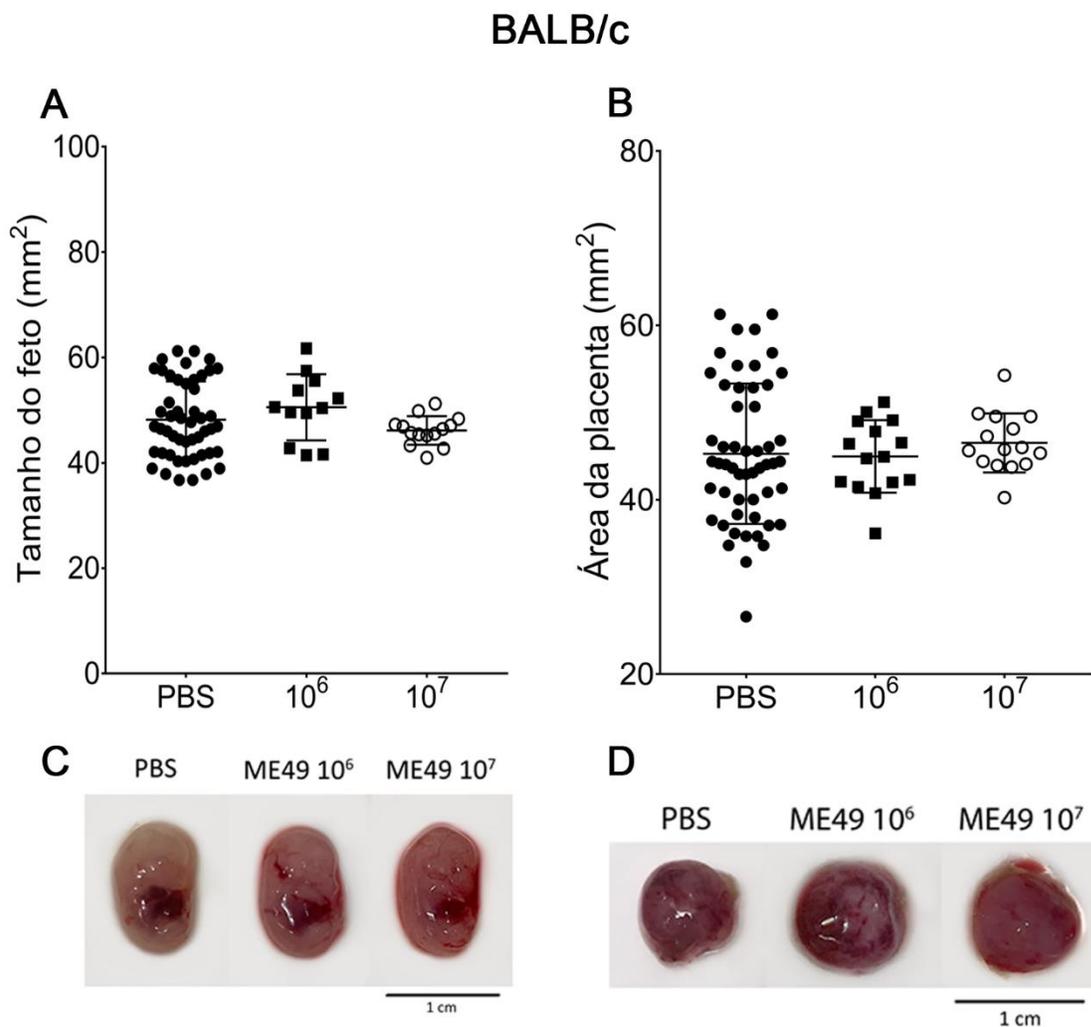


Figura 4.13. Área dos fetos e placentas de animais BALB/c. A: Área dos fetos obtidas pelos diâmetros de coroa-cóccix e frontal-occipital e expressas em mm². B: Área das placentas obtidas pela média entre duas medições (horizontal e vertical), seguida de cálculo de raio e área. C e D: Imagens representativas dos experimentos. Foram analisados pelo menos 5 fetos e placentas de 2-4 experimentos independentes.

4.2.3 Avaliação histopatológica de placentas

A fim de avaliar o aspecto patológicos dos tecidos após infecção materna, fizemos o processamento histológico de placentas da linhagem BALB/c. Nas duas cargas parasitárias avaliadas (10^6 e 10^7) observamos danos histológicos em relação às placentas do grupo não infectado. No grupo 10^6 , observamos focos de necrose e apoptose tecidual (Figura 4.14J), congestão dos vasos sanguíneos (Figura 4.14M) além da presença de taquizoítos de *T. gondii* (Figura 4.13N).

Já as placentas de fêmeas experimentalmente infectadas com 10^7 apresentaram um espessamento da camada de células trofoblásticas gigantes em comparação às placentas controle e redução da população de células trofoblásticas de glicogênio (Figura 4.14Q). Na região do labirinto destas placentas, houve um aumento de protusões celulares da zona juncional e focos de apoptose (Figura 4.14U).

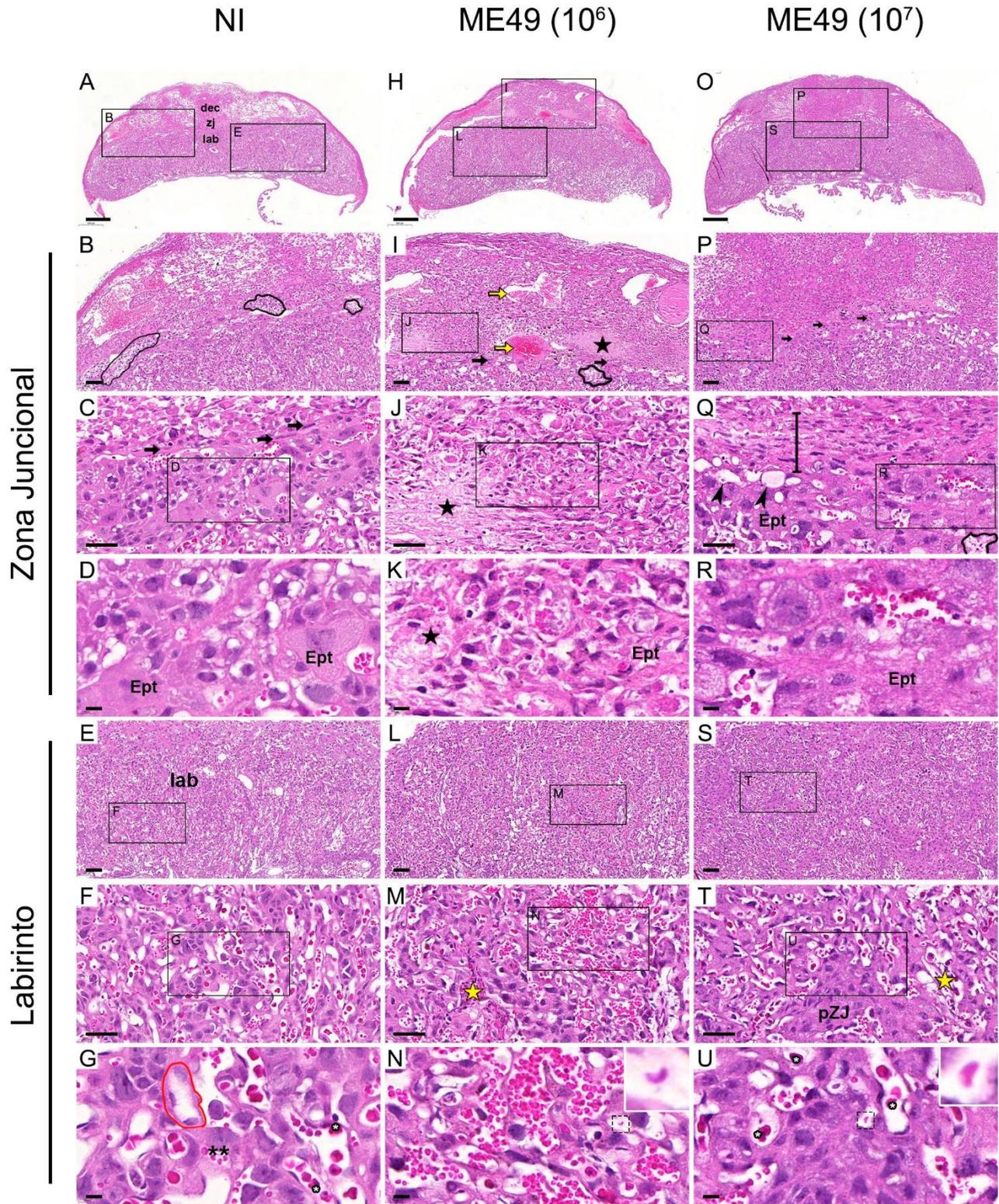


Figura 4.14. Avaliação histopatológica de placentas de BALB/c. As fêmeas de BALB/c foram eutanasiadas no dia E13.5 e as placentas foram reservadas, fixadas e processadas

para corte histológico e coloração padrão de hematoxilina-eosina (HE). **A-G**: nas placentas não infectadas a arquitetura está visivelmente dividida entre decídua (dec), zona juncional (zj) e labirinto (lab). **B**: é possível observar três sítios de células trofoblásticas de glicogênio (traçado preto), cuja característica é a vacuolização de citoplasma, e desempenham funções endócrinas. **C**: uma camada de CTG (seta) e o destaque para a população de Ept (**D**), células de importante função endócrina. No detalhe desta figura, podemos observar alguns capilares, que são as artérias espiraladas. **E-F**: o labirinto da placenta murina. **G**: magnificação do labirinto, onde vê-se os vasos da circulação materna (traçado vermelho), hemácias maternas (asteriscos pretos) e hemácias fetais nucleadas (asterisco branco). **H**: placenta infectada com 10^6 parasitos. A magnificação em **I** mostra pontos de congestão vascular (seta amarela), necrose (estrela preta, magnificado em **J**), CTG (seta preta) e poucas células trofoblásticas de glicogênio (traçado preto). **K**: Detalhe da camada de Ept. **L-N**: detalhes do labirinto. Em **M**, focos de apoptose da vasculatura (estrela amarela). **N**: Acentuada congestão da vasculatura materna e presença de taquizoítos de *T. gondii* (quadrado pontilhado). **O-Q**: detalhes da arquitetura da zona juncional e decídua. Em **P**, os CTG (seta). **Q**: espessamento da camada de CTG (linha), vacuolização celular (cabeça de seta). **R**: Detalhe da camada de espongiotrofoblastos. **S-T**: labirinto com projeções espessas da zona juncional (pZJ). **U**: presença de hemácias fetais nucleadas (asterisco branco) e de parasitos que chegam a partir dos sinusoides maternos (quadrado pontilhado). n=2. Barras de escala figuras **A-H-O**: 500 μm ; **B-I-P** e **E-L-S**: 100 μm ; **C-J-Q** e **F-M-T**: 50 μm ; **D-K-S** e **G-N-U**: 10 μm .

4.3 Determinação da carga parasitária por qPCR

Após o registro morfométrico, os tecidos maternos e fetais foram processados também para diagnóstico molecular. Para determinação da carga parasitária nos tecidos, optamos pelo PCR quantitativo utilizando *SYBR Green*. Construímos uma curva padrão específica para cada tecido (baço, fígado, cérebro, cabeça do feto e placentas) e para cada alvo (β -Actina e Toxo_RE) partindo de valores equivalentes distintos para os tecidos (de 1 a 12 mg) e valores equivalentes desde 1 a 10^5 parasitos.

Com relação aos parâmetros da curva, obtivemos coeficientes de determinação bem próximos a 1 e eficiências de amplificação acima de 90%, com exceção dos fígados maternos, cuja eficiência variou entre 78 e 77 para os alvos de β -Actina e Toxo_RE, respectivamente (Tabela 3).

Padronizamos a reação com temperatura de anelamento de 64°C por 1 minuto e concentração de *primers* para β -Actina em 150 nM e para Toxo_RE em 300 nM. Para β -Actina obtivemos os parâmetros de *threshold cycle* (C_t) variando entre 14 e 30 para tecidos como baço e cabeça do feto e 20 a 32 para a placenta (Figura 4.15A). As temperaturas de *melting* (T_m) variaram entre 82°C para cabeça do feto e placenta e 86°C para os demais tecidos maternos (Figura 6B). Para o alvo Toxo_RE, as T_m (Figura 4.14C) e valores de C_t variaram na mesma faixa (Figura 4.15D). Estes resultados juntos demonstram a eficiência e especificidade do método de detecção do parasito baseado em PCR quantitativo.

Tabela 3 – Parâmetros de linearidade de amplificação de *Toxoplasma gondii* nos tecidos de camundongos.

Alvos	Tecidos	Tamanho do amplicon	Extensão dinâmica (mg tecido)	Coefficiente angular (a)	Interseção (b)	Coefficiente de determinação (r ²)	Eficiência de amplificação (%)
β-Actina	Placenta	349 bp	12,14 – 12,14x10 ⁻⁴	-3,459	21,807	0,975	94,58
	Cabeça		1,93 - 1,93x10 ⁻⁴	-3,547	17,411	0,993	91,40
	Cérebro		2,74 - 2,74x10 ⁻⁴	-3,208	35,352	0,996	104,98
	Fígado		3,28 - 3x28x10 ⁻⁴	-3,967	19,770	0,998	78,69
	Baço		1,12 – 1,12x10 ⁻⁴	-3,584	17,015	0,996	90,12
Toxo_RE	Placenta	81 bp	10 ⁵ - 10 ⁰	-3,441	36,185	0,981	95,26
	Cabeça			-3,469	35,353	0,995	94,19
	Cérebro			-3,341	30,892	0,988	99,21
	Fígado			-3,996	33,324	0,993	77,93
	Baço			-3,466	30,917	0,981	95,07

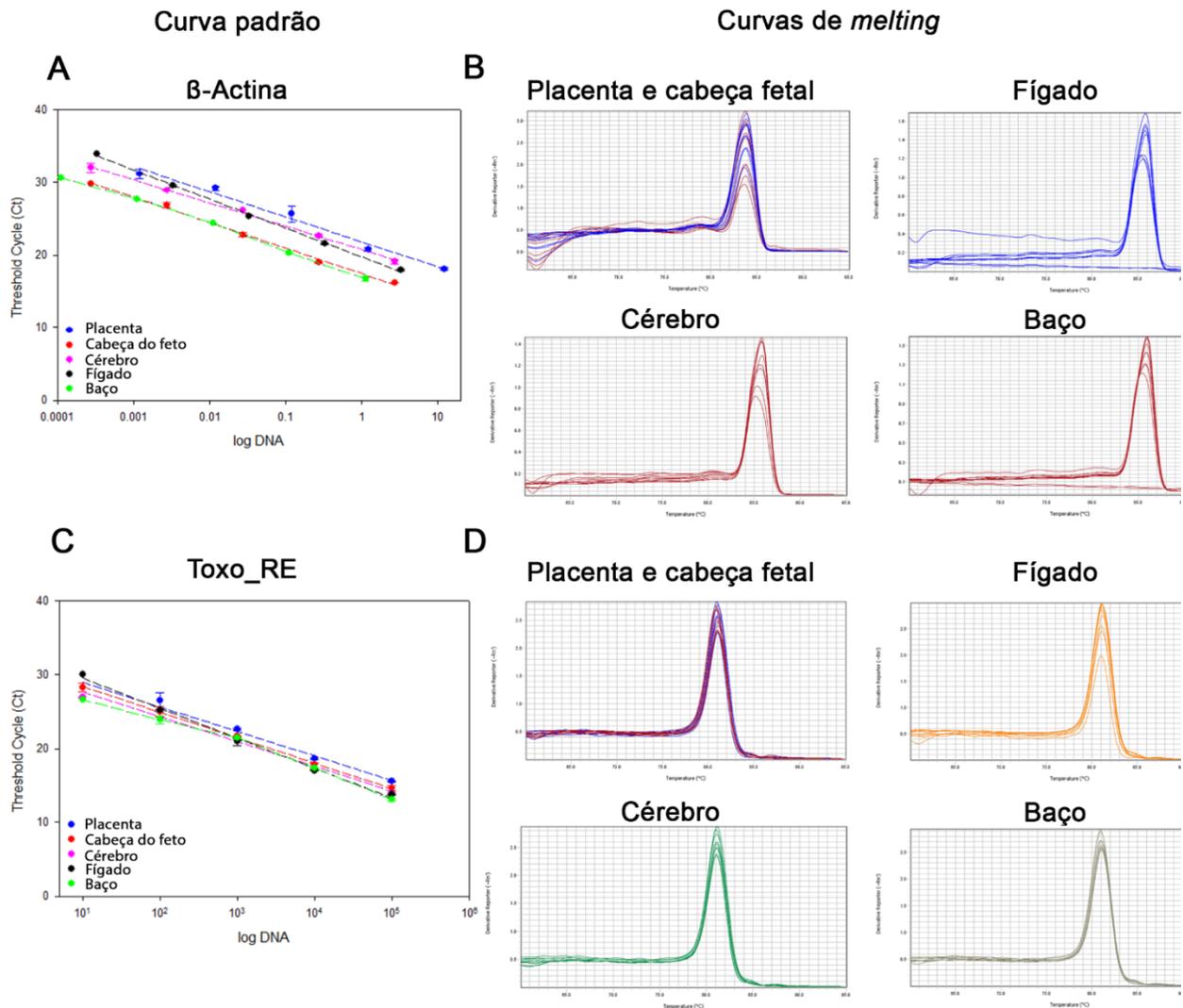


Figura 4.15. Padronização da reação de qPCR para diagnóstico molecular de *T. gondii* em tecidos. Os tecidos foram contaminados artificialmente com uma suspensão de 10^6 taquizoítos e a suspensão de DNA foi diluída em série para determinação da curva padrão. A e C: Curva padrão do alvo endógeno β -Actina e Toxo_RE em diferentes tecidos (placenta, cabeça do feto, cérebro, fígado e baço). B e D: Curvas de *melting* dos alvos β -Actina e Toxo_RE nos diferentes tecidos analisados.

4.4 Diagnóstico molecular de tecidos maternos e fetais

Após a etapa de padronização, avaliamos a carga parasitária de tecidos maternos (baço e placenta) e fetais (cabeça inteira) dos animais da linhagem Swiss Webster por qPCR. Analisamos 17 cabeças fetais, 19 placentas e 6 baços. Neste protocolo, após a extração de DNA, tivemos que diluir os volumes em 10 vezes para performar as quantificações.

Vimos que os baços das fêmeas experimentalmente infectadas com 10^7 taquizoítos têm uma carga parasitária que varia entre 5 mil e 35 mil parasitos por miligrama de tecido. Já nas placentas, as maiores cargas parasitárias pertencem às fêmeas inoculadas com 10^6 parasitos. As cabeças fetais analisadas tinham uma maior carga parasitária no grupo de fêmeas experimentalmente infectadas com 10^7 parasitos. No grupo de animais do inóculo menor (10^6), somente um animal tinha carga parasitária quantificável (Figura 4.16).

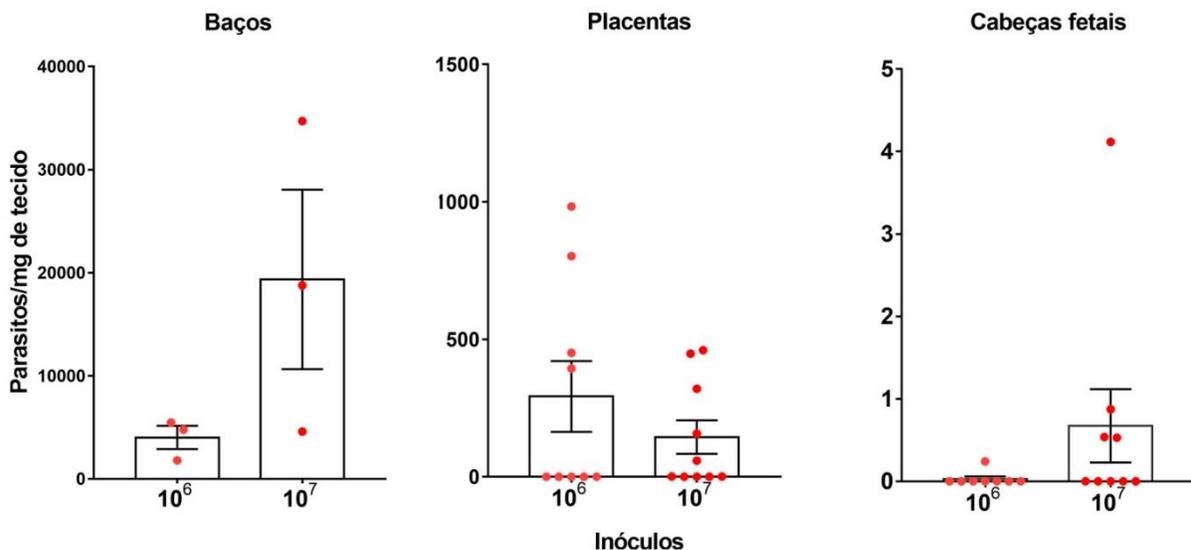


Figura 4.16. Cargas parasitárias dos tecidos da linhagem Swiss Webster. Os tecidos maternos (baços e placentas) e fetais (cabeças inteiras) foram fracionados, lisados quimica e mecanicamente e o DNA extraído foi diluído 10 vezes para diagnóstico molecular via qPCR. Os valores foram normalizados pelo alvo endógeno

β -Actina para quantificação. Foram analisadas pelo menos 2 unidades placenta/embrião de 3 fêmeas por inóculo.

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos implementar um modelo de toxoplasmose congênita focado no período equivalente em humanos ao primeiro trimestre de gestação. Na toxoplasmose congênita humana, os danos aos conceptos em desenvolvimento tendem a ser mais graves no primeiro trimestre, embora a taxa de transmissão seja menor em relação aos trimestres seguintes (48). Já em modelos animais, observam-se efeitos mais agressivos nos períodos correspondente aos dois trimestres finais de gestação com a cepa PRU (tipo II, pouco virulenta, isolada de feto natimorto), utilizando o estágio evolutivo de oocistos (67).

Antes de discutir os achados propriamente, é importante ressaltar que metade deste trabalho foi realizado durante a pandemia do SARS-CoV-2, entre 2020 e 2021. Neste período, a pesquisa foi paralisada por causa do isolamento social, e o retorno à experimentação foi lento e gradual. Portanto, o leitor perceberá que para cada resultado, a cepa de parasito utilizada foi distinta, já que o tempo hábil para execução dos experimentos foi reduzido drasticamente. O intuito inicial era o de comparar as duas cepas de parasitos e as duas linhagens de camundongos em todos os experimentos realizados.

Um de nossos esforços para entender a interação parasito-hospedeiro e autofagia foi a imunomarcagem de culturas de trofoblastos, BeWo, infectadas com taquizoítos de *T. gondii* por 3 ou 24h. A partir de uma avaliação qualitativa, vimos que há *puncta* de LC3b distribuídas nas células, sobretudo nas infectadas. Ainda, pudemos observar pontos de sobreposição dos canais de fluorescência do parasito com o LC3, indicando que os parasitos poderiam ser alvo da via de autofagia. É importante ressaltar que a sequência de LC3 do *T. gondii* é homóloga à LC3 de mamíferos e, por isso, vê-se o parasito totalmente marcado (91). Nosso rastreamento da autofagia com o MDC sugeria que a infecção induzia a autofagia após 3h. Este composto fluorescente acumula-se em compartimentos acídicos – tais quais autofagossomos, permitindo-nos fazer uma cinética de infecção e estimar em quais tempos observaremos autofagia do hospedeiro.

Por outro lado, nossa análise ultraestrutural revelou a presença de figuras sugestivas de autofagia, como corpos multilamelares e vacuolização de dupla membrana eletrondensa, após 24h. Além disso, nas culturas infectadas vimos uma desestabilização da membrana do vacúolo parasitóforo, como observado anteriormente pelo nosso grupo num outro modelo celular (91). Curiosamente, essas figuras sugestivas de autofagia na MET ocorreram somente nas células infectadas, e não nas culturas controle; ao mesmo tempo, não vimos associação direta destas estruturas com vacúolos parasitóforos (VP), somente a proximidade entre as estruturas sugestivas de autofagia e os VP com a membrana desestabilizada. Análises de *puncta* de LC3 e imunoprecipitação desta proteína nas células trofoblásticas poderão futuramente fornecer dados mais assertivos acerca do papel da autofagia na infecção pelo *T. gondii*. Estas análises permanecem como perspectivas de continuidade deste trabalho.

Em seguida, buscamos estabelecer um modelo murino de toxoplasmose congênita partir de lacunas experimentais previamente apontadas em 2016 (67). Por exemplo, não foi observado um consenso na cepa de parasito e nem no modelo animal utilizados para modelos em toxoplasmose congênita; observou-se que os modelos variavam entre roedores e grandes mamíferos. Embora as cepas do tipo I sejam virulentas e mais eficazes na infecção em humanos, em modelos animais esta eficácia não foi observada (67). Ainda, a rota de infecção não era consensual; muitos trabalhos utilizaram a via intraperitoneal e a gavagem como rotas de infecção, embora estas duas vias não representem a infecção e transmissão natural do parasito (67).

Por último, nesta revisão os autores afirmam ser necessário a condução de experimentos que controlem o número exato de taquizoítos chegando na corrente sanguínea e, portanto, na placenta materna – controle que não foi observado nos trabalhos utilizando oocistos ou cistos teciduais de *T. gondii* (67). Portanto, em nosso modelo nós utilizamos duas linhagens de camundongos: uma isogênica, BALB/c, e outra não-isogênica, Swiss Webster, e as infectamos com taquizoítos da cepa tipo II ME49 via intravenosa, mimetizando a rota que os taquizoítos percorrem desde o estômago até a via hematogênica, onde ganham acesso aos órgãos maternos e à placenta/embrião em desenvolvimento (46,68).

Nossos dados mostram que durante a infecção no primeiro trimestre, observam-se eventos de reabsorções, hemorragias e fetos com malformações, categorizados como “amorfos”. Uma questão intrigante para nós, uma vez que os camundongos tenham gestações com múltiplos filhotes, é a interpretação das fêmeas não-grávidas. O critério para dizer se uma fêmea de camundongo está grávida é o aumento de peso. Os animais da linhagem BALB/c tendem a ganhar peso significativamente após o 9º dia pós-coito, em contraste com os Swiss que começam a ganhar peso no dia 11 (101). Em nosso modelo, as fêmeas grávidas têm um ganho de peso a partir do dia de detecção do plugue, com curvas de ganho semelhantes às observadas previamente (101) e estas têm reabsorções visíveis, independentemente da condição experimental. Há uma taxa de falso plugue tanto nas condições controle quanto nas condições de infecção.

Camundongos infectados com *T. gondii* apresentam esplenomegalia acentuada a depender da carga parasitária da infecção, bem como morfologia alterada deste tecido (102). Pudemos observar no nosso modelo de toxoplasmose congênita que as fêmeas infectadas com *T. gondii* têm aumento de área e peso do baço. Este aumento pode ser caracterizado por infarto do tecido e/ou por acúmulo de parasitos neste tecido (68). Embora não tenhamos dados de histopatologia dos baços das fêmeas analisadas, sabemos que há uma expressiva carga parasitária no baço das fêmeas avaliadas, a partir das curvas de amplificação em ciclos iniciais da qPCR, sugestivo de que as fêmeas infectadas são capazes de reter parte da infecção sistêmica neste tecido e corroborando os achados de Villavicencio e colaboradores (68).

O *T. gondii* alcança o concepto em desenvolvimento a partir da transmissão placentária, utilizando a rota hematogênica para se dispersar no organismo materno e chegar aos vasos sanguíneos da placenta (46). Sabemos que a placenta pode funcionar como um “filtro”, retendo a infecção ainda no tecido materno e impedindo que os patógenos alcancem o concepto em desenvolvimento (61,68,96). Avaliamos a área das placentas das duas linhagens de camundongo e, para a linhagem BALB/c, não houve diferença estatística entre o tamanho das placentas ou dos fetos em nenhum dos grupos avaliados. Por outro lado, as placentas das fêmeas Swiss Webster experimentalmente infectadas com 10^7 taquizoítos são significativamente menores do que as placentas de

fêmeas com inóculo de 10^6 parasitos. Nossa abordagem morfométrica de fetos, placentas e baços fornece preciosas informações acerca da patogenia no estudo da toxoplasmose congênita murina. Grande parte dos trabalhos nesta área não contabilizou os fetos amorfos ou reabsorvidos, uma vez que estes achados não eram relevantes para a questão abordada (67), ou sequer mediu os animais para determinar o fenótipo de macro- ou microcefalia clássicos da doença.

Curiosamente, os fetos provenientes de fêmeas infectadas com 10^5 taquizoítos têm uma área significativamente maior que os fetos provenientes de fêmeas controle, apresentando o equivalente a um fenótipo de macrocefalia, enquanto os fetos com carga maior (10^7) apresentam um fenótipo semelhante a microcefalia ou são menores/subdesenvolvidos. Uma hipótese possível é a da regulação, a partir de antígenos liberados pelos parasitos, das proteínas Akt-mTORc1. Brevemente, a cascata destas duas proteínas regula o crescimento celular. No entanto, o tipo 3 (Akt-3) está relacionado a eventos de displasias corticais e crescimento de neurônios dismórficos (103), e esta proteína é expressa no sistema nervoso central no período embrionário. Sabemos que uma das sequelas da toxoplasmose congênita é o aumento do diâmetro cefálico ao nascer e, posteriormente, a ocorrência de lesões neurológicas, como epilepsias e comprometimentos comportamentais; e o *T. gondii* é capaz de liberar antígenos que regulam positivamente a proteína Akt-3 e, por conseguinte, a via de mTOR (104).

Logo, é possível que o parasito esteja modulando a via de autofagia – hipótese do nosso trabalho – só que, diferentemente do que acreditávamos – que a autofagia seria regulada, primariamente, nas placentas – isto poderia ocorrer no sistema nervoso central, ainda na etapa de desenvolvimento. Enquanto o fenótipo macro- está relacionado a uma regulação positiva desta proteína, o fenótipo de microcefalia está relacionado à deleção desta (103). Uma vez que a infecção experimental das fêmeas grávidas ocorra no estágio onde o sistema nervoso central ainda está se desenvolvendo, segundo o Manual dos Estágios de Theiler (105), nos questionamos dessa possibilidade. Experimentos precisariam ser feitos para aferir a validade desta hipótese, além de avaliar também a carga parasitária dos tecidos.

É importante mencionar que as alterações de macro- e microcefalia estão relacionadas a fenótipos visíveis. Isto é: a partir do diâmetro cefálico dos animais, numa determinada idade, nós atribuímos de forma qualitativa estes nomes. O que precisaríamos avaliar é a histologia destes tecidos, a fim de ver infartos e aumento na região dos ventrículos; e, se possível, análises de tomografia da região cefálica destes animais, buscando por aumento do hemisfério cerebral, como observado em humanos (103). Uma análise muito interessante seria verificar o desenvolvimento dos animais nascidos de mães experimentalmente infectadas ao longo de um determinado período de meses, a fim de ver se a infecção causou de fato um comprometimento neurológico e, em caso positivo, se este poderia ser minimizado a partir do bloqueio farmacológico da autofagia durante a gestação.

O aumento significativo de área das placentas experimentalmente infectadas com 10^6 taquizoítos, junto ao aumento do baço a partir da infecção, sugerem que estes tecidos maternos possam reter a infecção a nível sistêmico e atuar como barreira na transmissão vertical. Quando estes dois tecidos estão altamente infectados, dificilmente observamos cabeças fetais infectadas. Por outro lado, o maior inóculo (10^7) leva a um aumento do baço e infecção deste, concomitantemente a uma redução na área da placenta, possivelmente porque houve danos à integridade de barreira transepitelial desta. Esta integridade pode ser aferida a partir da imunomarcagem contra a proteína de zona de oclusão 1 (ZO-1) (63,64). Vimos que esta proteína tem sua marcação perturbada em culturas experimentalmente infectadas *in vitro*.

Nossa análise histológica revelou danos às placentas experimentalmente infectadas. Nas placentas do dia embrionário que avaliamos (E13.5) é comum observarmos uma diferença marcante entre as diferentes regiões da placenta: decídua, zona juncional, labirinto e placa coriônica. Há características marcantes a cada uma destas regiões: a decídua é separada da zona juncional a partir da presença de células trofoblásticas gigantes. A zona juncional é caracteristicamente avascular, quando os tecidos são submetidos a imuno-histoquímica para detecção de CD31, marcador de células endoteliais. Por fim, no labirinto e placa coriônica, observamos vasos sanguíneos – sendo o labirinto a região de maior irrigação de toda a placenta, pois observam-se

vasos maternos e fetais (106). Em nossa análise, observamos que as placentas controle, de fato, recapitulam esta descrição histológica; já as placentas infectadas, não.

Macroscopicamente, as placentas infectadas parecem ser maiores. A depender do insulto recebido, a placenta pode sofrer alterações a nível de formação do labirinto ou zona juncional, por exemplo (107). Tivemos dificuldade de identificar as populações celulares do maior inóculo (10⁷), pois havia, por exemplo, o espessamento de uma população celular (CTG) e a redução de outra (células trofoblásticas de glicogênio). Esta última é fundamental na regulação endócrina da placenta. Conseguimos identificar a presença de parasitos nos dois grupos experimentais, embora não tenhamos identificado focos de replicação intracelular. Os parasitos estavam localizados nos sinusoides da circulação materna, na região do labirinto; como a infecção foi realizada via intravenosa na região da cauda, é esperado que observássemos parasitos nestes vasos, e não nos vasos fetais ou outras regiões da placenta. A detecção do parasito por histologia, bem como as observações em relação a necrose, apoptose e congestão estão alinhadas com o que já havia sido descrito na mesma linhagem de camundongo (68).

Outro possível impacto da infecção na placenta é a diminuição da área correspondente ao labirinto. Danos a esta área são comuns em infecções patogênicas, como por exemplo por Zika, *Plasmodium* sp. ou mesmo o *T. gondii*, e estão relacionadas a restrições de crescimento intrauterino (68,96,108). Vimos que a infecção leva a um aumento da congestão de vasos no grupo 10⁶, mas aparentemente sem impactar na complexidade vascular do labirinto; já as placentas do maior inóculo apresentam um grande número de protusões no labirinto que partem da zona juncional, além de focos de apoptose e necrose nessa região. Danos à placenta foram revertidos *in vivo* após administração de hidroxicloroquina via oral por cinco dias em fêmeas experimentalmente infectadas com Zika. Uma vez que o *T. gondii* seja capaz de se beneficiar da autofagia do hospedeiro (90,109), nos perguntamos se essa abordagem experimental seria igualmente eficaz em nosso modelo. Nossa hipótese é de que, sim; a proliferação do parasito na placenta seria tolhida a partir do tratamento com hidroxicloroquina.

Para detecção do parasito nos tecidos maternos e fetais, padronizamos uma reação de qPCR pelo sistema *SYBR Green*. Esta forma de detecção é mais barata do

que a reação utilizando sondas fluorescentes - frequentemente usada na literatura de toxoplasmose congênita. Ainda, o diagnóstico molecular por *SYBR Green* já foi utilizado para roedores infectados por *L. braziliensis* (110). Embora este sistema imponha algumas dificuldades de padronização, sobretudo por conta de ampliações inespecíficas, conseguimos contornar isto e criamos um sistema de detecção mais barato e reproduzível. Obtivemos uma eficiência na amplificação acima de 90% em quase todos os tecidos avaliados, à exceção do fígado materno (Tabela 3). Uma outra dificuldade que encontramos foi a inespecificidade de amplificação do parasito, nos tecidos, frente a uma alta carga parasitária. Para contornar este problema, na ocasião da extração de DNA, o material foi diluído a uma concentração 10 vezes menor que a inicial. Com esta adaptação, abolimos de vez as ampliações inespecíficas mesmo em tecidos com alta infecção, como placentas e baços.

Por fim, neste trabalho nós utilizamos duas linhagens de camundongos e obtivemos resultados interessantes em animais da linhagem Swiss Webster. Como fora mencionado na introdução deste trabalho, os camundongos não-isogênicos apresentam proles maiores; uma crítica da literatura ao seu uso era, justamente, que estes animais não forneciam resultados reproduzíveis, com significância, ao contrário dos animais isogênicos. Neste trabalho, vimos que os aspectos centrais da infecção (morfometria, carga parasitária) foram recapitulados na linhagem Swiss Webster. Pensando num modelo de toxoplasmose congênita que recapitule aspectos clássicos da doença nos conceitos, para nós faz sentido utilizar os animais não-isogênicos como modelo, ao menos se estivermos estudando um modelo de primeiro trimestre – que foi a proposta desta dissertação. Com este modelo em mãos, poderemos testar abordagens terapêuticas que diminuam ou cessem a transmissão vertical do parasito e restaurem a homeostase placentária.

VI. CONCLUSÕES

- A infecção por *T. gondii* induz a autofagia de trofoblastos *in vitro*, além de perturbar a integridade da barreira placentária;
- O modelo murino de toxoplasmose congênita recapitulou aspectos da patologia em humanos, tais quais: macro- e microcefalia, danos à arquitetura placentária, presença de parasito em tecidos maternos e fetais e esplenomegalia. No entanto, não impactou no ganho de peso das fêmeas grávidas;
- A infecção leva a alterações histológicas da placenta, tais quais: focos necróticos, apoptóticos e desorganização das subpopulações de trofoblastos murinos;
- A carga parasitária onde se observam efeitos mais drásticos na infecção é a de 10^7 parasitos e foi a única onde a maioria das cabeças fetais analisadas tinha níveis detectáveis de infecção.
- Nossos resultados sugerem que a autofagia de trofoblastos pode ser modulada pela infecção por *T. gondii in vitro* e *in vivo*. Nossas perspectivas incluem a modulação farmacológica da autofagia nestes dois modelos para melhor investigar o papel da autofagia no desfecho da doença.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DUBEY JP. The History of *Toxoplasma gondii* - "The First 100 Years". *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2008 Nov 1;55(6):467–75.
2. Splendore A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel – *ScienceOpen* [Internet]. *Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo*. 1908 [cited 2021 Oct 21]. p. 109–12. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=25671b67-d201-4dd3-a202-1bb070c2c1ec>
3. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90203.
4. Houdek P. TOXOPLASMA GONDII ON MANAGERS AND EMPLOYEES. *Management Perspectives*. 2017;31(1):63–81.
5. Oréfice F, Filho RC, Barboza AL, Oréfice JL, Calucci D. Toxoplasmose ocular adquirida Toxoplasmose ocular pós-natal. Vol. 69, *Revista Brasileira de Oftalmologia*. Sociedade Brasileira de Oftalmologia; 2010. p. 184–207.
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>
7. Garcia Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2003 Jan 1;9(1):55–62.
8. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000 Nov 1;30(12–13):1217–58.
9. Vigilância Sanitária identifica surtos de toxoplasmose em restaurantes de São Paulo - *PEBMED* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://pebmed.com.br/vigilancia-sanitaria-identifica-surtos-de-toxoplasmose-em-restaurantes-de-sao-paulo/>
10. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Relatório de atualização de investigação de surto [Internet]. 2018 [cited 2021 Jul 15]. p. 1. Available from: <http://www.santamaria.rs.gov.br/docs/noticia/2018/10/D19-1566.pdf>
11. ToxoDB [Internet]. [cited 2021 Oct 21]. Available from: <https://toxodb.org/toxo/app>
12. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014;141(4):453–61.

13. De A, Ferreira M, Wagner R, Vitor A, Tostes Gazzinelli R, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. 2005;
14. Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002 Nov 1;40(11):4037–44.
15. ME G, JP D, RB N. Ocular toxoplasmosis: lessons from Brazil. *American journal of ophthalmology*. 2015 Jun 1;159(6):999–1001.
16. Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(4):1566–70.
17. Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. 2018;
18. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2004;34(10):1185–96.
19. Szabo EK, Finney CAM. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. *Trends in Parasitology*. 2017;33(2):113–27.
20. Sabin AM. TOXOPLASMIC ENCEPHALITIS IN CHILDREN. *The Journal of the American Medical Association*. 1941;116(9).
21. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(6):1561–6.
22. Fux B, Ferreira A, Cassali G, Tafuri W, Vitor R. Experimental toxoplasmosis in Balb/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000 Jan;95(1):121–6.
23. Roberts CW. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: Vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*. 1992;104(1):19–23.
24. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Vol. 11, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 1998. p. 267–99.
25. Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2009 Jul 1;39(8):877–82.

26. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology*. 2010 Jan 1;124(1):10–25.
27. Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites and Vectors*. 2020;13(1):1–13.
28. Souza W de, Belfort Jr R. *Toxoplasmosose e Toxoplasma gondii*. 22nd ed. Canossa Mendes JC, Freitas CM de, Hochman G, editors. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. 214.
29. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002 Oct 1;8(10):634–40.
30. Vanwormer E, Conrad PA, Miller MA, Melli AC, Carpenter TE, Mazet JAK. *Toxoplasma gondii*, source to sea: Higher contribution of domestic felids to terrestrial parasite loading despite lower infection prevalence. *EcoHealth*. 2013;
31. Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, de Wit LA, VanWormer E, et al. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. Vol. 15, *Food and Waterborne Parasitology*. Elsevier Inc; 2019. p. e00049.
32. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*. 2008 Sep 1;38(11):1257–78.
33. Souza W de. Aspectos ultraestruturais do processo de divisão do *Toxoplasma gondii*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1974 Feb;8(1):45–65.
34. Santiago-Tirado FH, Doering TL. False friends: Phagocytes as Trojan horses in microbial brain infections. *PLoS pathogens*. 2017;13(12):e1006680.
35. Coombes JL, Charsar BA, Han S-JS-J, Halkias J, Chan SW, Koshy AA, et al. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 May 21;110(21):E1913-22.
36. Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular Microbiology*. 2006 Oct;8(10):1611–23.
37. De Assis Moura M, Reis Amendoeira MR, Santos Barbosa H. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. 2009;104(6):862–4.
38. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis - General Information - Frequently Asked Questions (FAQs). 2020.

39. CATARINA EDS, SAÚDE SDE DA, SAÚDE SÚ DE, SAÚDE SDVE, EPIDEMIOLÓGICA DDV. NOTA TÉCNICA CONJUNTA N° 008/2019 DAPS/DIAF/DIVE/LACEN. Santa Catarina, RS; 2019.
40. Frenkel JK. Toxoplasmose. São Paulo, SP: Guanabara Koogan; 2002. 1310–1324.
41. Andrade GM, Aguiar RA. PROGRAMA DE CONTROLE DA TOXOPLASMOSE CONGENITA EM MINAS GERAIS ATUALIZAÇÃO SOBRE TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE NA GESTAÇÃO: ALTERNATIVAS AO USO DA ESPIRAMICINA NO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE AGUDA [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. p. 2. Available from: <http://www.uptodate.com/online>.
42. Konradt C, Ueno N, Christian DA, Delong JH, Pritchard GH, Herz J, et al. Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nature microbiology*. 2016;1(3):16001.
43. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 2004 Jun 12;363(9425):1965–76.
44. Osorio-Pinzón J, Pinzón-Tovar A, Vargas-Plazas HI, Barreto-Mora J, Muñoz-Delgado DY, Santana-Velasco D, et al. Perfil hormonal, metabólico y hematológico en adultos con el Virus de Inmunodeficiencia Humana. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2018 Nov 20;50(4):296–306.
45. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical Infectious Diseases*. 1992;15(2):211–22.
46. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections. Vol. 42, *Clinics in Perinatology*. W.B. Saunders; 2015. p. 77–103.
47. Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*. 2012 Jan;80(1):418–28.
48. Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier MN, et al. Ocular toxoplasmosis - An update and review of the literature. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):345–50.
49. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999;353(9167):1829–33.
50. Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*. 2010;26(4):190–6.
51. Thulliez P, Elbez-Rubinstein A, Dardé M, Dumètre A, Cohen R, Ajzenberg D, et al. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report,

- Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;199(2):280–5.
52. Wolf A, Cowen D, Paige B. Human toxoplasmosis: Occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*. 1939;89(2306):226–7.
 53. Cowen D, Wolf A. Experimental Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1951;10(1):1–15.
 54. Buxton D, Finlayson J. EXPERIMENTAL INFECTION OF PREGNANT SHEEP WITH TOXOPLASMA. *J Comp Path*. 1986;96.
 55. Ferro EAV, Bevilacqua E, Favoreto-Junior S, Silva DAO, Mortara RA, Mineo JR. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. *Parasitology Research*. 1999;85(8–9):647–54.
 56. Fialho CG, Mendez J, Falcón JD, González M, Araujo FAP, Bigatti LE, et al. *Toxoplasma gondii*: Congenital transmission in a hamster model. *Experimental Parasitology*. 2009;122(2):140–4.
 57. Zenner L, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, Capron A. Rat model of congenital toxoplasmosis: Rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. *Infection and Immunity*. 1993;61(1):360–3.
 58. Dubey JP, Schlafer DH, Urban JF, Lindsay DS. Lesions in Fetal Pigs with Transplacentally-induced Toxoplasmosis. *Veterinary Pathology*. 1990;27(6):411–8.
 59. Dubey JP, Shen SK. Rat model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 1991;59(9):3301–2.
 60. Freyre A, Falcón J, Méndez J, Rodriguez A, Correa L, González M. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*. 2006;113(3):154–60.
 61. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M. *Toxoplasma gondii*: An improved rat model of congenital infection. *Experimental Parasitology*. 2008;120(2):142–6.
 62. Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*. 2012;15(1):36–43.
 63. Zeldovich VB, Clausen CH, Bradford E, Fletcher DA, Maltepe E, Robbins JR, et al. Placental Syncytium Forms a Biophysical Barrier against Pathogen Invasion. *PLoS Pathogens*. 2013;9(12):1–10.

64. Rothbauer M, Patel N, Gondola H, Siwetz M, Huppertz B, Ertl P. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–11.
65. Miranda J, Martín-Tapia D, Valdespino-Vázquez Y, Alarcón L, Espejel-Nuñez A, Guzmán-Huerta M, et al. Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability. *Cells*. 2019 Sep 29;8(10):1174.
66. Ander SE, Rudzki EN, Arora N, Sadovsky Y, Coyne CB, Boyle JP. Human Placental Syncytiotrophoblasts Restrict *Toxoplasma gondii* Attachment and Replication and Respond to Infection by Producing Immunomodulatory Chemokines. 2018;
67. Liempi A, Castillo C, Carrillo I, Muñoz L, Droguett D, Galanti N, et al. A local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta: The epithelial turnover of the trophoblast. *Microbial Pathogenesis*. 2016;99:123–9.
68. Vargas-Villavicencio JA, Besné-Mérida A, Correa D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. *Veterinary parasitology*. 2016 Jun 15;223:195–204.
69. Vargas-Villavicencio JA, Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Besné-Mérida A, García-Vázquez F, Saldaña JI, et al. Mouse model of congenital infection with a non-virulent *Toxoplasma gondii* strain: Vertical transmission, “sterile” fetal damage, or both? *Experimental Parasitology*. 2016;166:116–23.
70. Krishnan L, Nguyen T, McComb S. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. *Journal of reproductive immunology*. 2013 Mar;97(1):62–73.
71. Coutinho LB, Gomes AO, Araújo ECB, Barenco PVC, Santos JL, Caixeta DR, et al. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. *International Journal for Parasitology*. 2012 Apr 17;42(4):341–52.
72. Shiono Y, Mun HS, He N, Nakazaki Y, Fang H, Furuya M, et al. Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon- γ deficient pregnant mice. *Parasitology International*. 2007;56(2):141–8.
73. McLeod, R; Frenkel, J. K; Estes, R. G ; Mack, D. G; Eisenhauer, P. B; Gibori G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *Journal of immunology*. 1988;140(5):1632–7.

74. Lahmar I, Guinard M, Sauer A, Marcellin L, Abdelrahman T, Roux M, et al. Murine neonatal infection provides an efficient model for congenital ocular toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*. 2010;124(2):190–6.
75. Chia R, Achilli F, Festing MF, Fisher EMC. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*. 2005;37(11):1181–6.
76. Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, et al. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011;7(2):127–58.
77. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(6):349–64.
78. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011;7(7):673–82.
79. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*. 2010 May;221(1):3.
80. V K, DG M, I N, I D. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular cell*. 2009 May 15;34(3):259–69.
81. Jin M, Liu X, Klionsky DJ. SnapShot: Selective Autophagy. *Cell*. 2013;152(0):368.
82. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. Vol. 28, *Annual review of physiology*. Annu Rev Physiol; 1966. p. 435–92.
83. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010;21(3):142–50.
84. Kudriaeva AA, Sokolov A V., Belogurov AA. Stochastics of degradation: The autophagic-lysosomal system of the cell. Vol. 12, *Acta Naturae*. Acta Naturae; 2020. p. 18–32.
85. Noda NN, Inagaki F. Mechanisms of Autophagy. *Annual Review of Biophysics*. 2015;44(1):101–22.
86. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*. 2000 Nov 1;19(21):5720–8.
87. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2013. p. 722–37.
88. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. Vol. 469, *Nature*. Nature Publishing Group; 2011. p. 323–35.
89. Elizabeth M. Selleck, a Robert C. Orchard, b Kara G. Lassen, c Wandy L. Beatty, a Ramnik J. Xavier, c, d Beth Levine, e Herbert W. Virgin b LDS. A Noncanonical Autophagy Pathway Restricts *Toxoplasma gondii* Growth in a

- Strain-Specific Manner in IFN- α -Activated Human Cells Elizabeth. *mBio*. 2015;6(5):1–2.
90. Sumpter R, Levine B. Autophagy and innate immunity: Triggering, targeting and tuning. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2010;21(7):699–711.
 91. Gao D, Zhang J, Zhao J, Wen H, Pan J, Zhang S, et al. Autophagy activated by *Toxoplasma gondii* infection in turn facilitates *Toxoplasma gondii* proliferation. *Parasitology Research*. 2014;113(6):2053–8.
 92. Souto XM, Barbosa HS, Menna-Barreto RFS. The morphological analysis of autophagy in primary skeletal muscle cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*. 2016;115(7):2853–61.
 93. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Vol. 12, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 1–222.
 94. Nakashima, akitoshi; shima, tomoko; aoki, aiko; kawaguchi, mihoko; yasuda, ippei; tsuda, sayaka; yoneda, satoshi; yamaki-ushijima, akemi; cheng, shibin; sharma, surendra; saito S. Placental autophagy failure: A risk factor for preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2020;46(12):2497–504.
 95. Doulaveris G, Orfanelli T, Benn K, Zervoudakis I, Skupski D, Witkin SS. A polymorphism in an autophagy-related gene, ATG16L1, influences time to delivery in women with an unfavorable cervix who require labor induction. *Journal of Perinatal Medicine*. 2013 Jul;41(4):411–4.
 96. Cao B, Macones C, Mysorekar IU. ATG16L1 governs placental infection risk and preterm birth in mice and women. *JCI Insight*. 2016 Dec 22;1(21).
 97. Cao B, Parnell LA, Diamond MS, Mysorekar IU. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *The Journal of experimental medicine*. 2017 Aug 7;214(8):2303–13.
 98. Moreira-Souza ACA, Marinho Y, Correa G, Santoro GF, Coutinho CMLM, Vommaro RC, et al. Pyrimidinergic Receptor Activation Controls *Toxoplasma gondii* Infection in Macrophages. *PLoS one*. 2015;10(7):e0133502.
 99. Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2. *Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde Volume 2*. Editora Fiocruz; 2010. 89–188.
 100. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa A-R, Reischer GH, Kratochwill K, Förster-Waldl E, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. 2008;

101. Jones LA, Roberts F, Nickdel MB, Brombacher F, McKenzie ANJ, Henriquez FL, et al. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *European Journal of Immunology*. 2010;40(2):426–36.
102. Finlay JB, Liu X, Ermel RW, Adamson TW. Maternal Weight Gain as a Predictor of Litter Size in Swiss Webster, C57BL/6J, and BALB/cJ mice. 2015;54(6).
103. Fuentes-Castro BE, Reyes-García JG, Valenzuela-Vargas MT, Martínez-Gómez F. Histopathology of murine toxoplasmosis under treatment with dialyzable leukocyte extract. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017 Nov 1;112(11):741–7.
104. Winden KD, Yuskaitis CJ, Poduri A. Megalencephaly and macrocephaly. *Seminars in Neurology*. 2015;35(3):277–87.
105. Chen J, Hu L, Wang J, Cao Y, Zhu D, Chen L, et al. *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens suppress Foxp3 via PI3K-AKT-mTOR signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(9):16044–51.
106. Theiler K. The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. The house mouse Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. 1972;
107. Isaac SM, Langford MB, Simmons DG, Adamson SL. Anatomy of the Mouse Placenta Throughout Gestation. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Elsevier; 2014. 69–73.
108. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9(September):1–18.
109. Fontes KN, Reginatto MW, Silva NL, Andrade CBV, Bloise FF, Monteiro VRS, et al. Dysregulation of placental ABC transporters in a murine model of malaria-induced preterm labor. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–13.
110. Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(3):1694–701.
111. Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Da-Cruz AM, Pinto EF, Moreira OC. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites and Vectors*. 2016 Jun 27;9(1).