

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUANA CARVALHO LUZ

O TRATAMENTO COM ÓLEO RESINA DE *Copaifera multijuga* EM CÉLULAS  
TROFOBLÁSTICAS HUMANAS VILOSAS (Linhagem BeWo) INFECTADAS POR  
*Toxoplasma gondii* REDUZ O PARASITISMO

UBERLÂNDIA - MG

2020

LUANA CARVALHO LUZ

O TRATAMENTO COM ÓLEO RESINA DE *Copaifera multijuga* EM CÉLULAS  
TROFOBLÁSTICAS HUMANAS VILOSAS (Linhagem BeWo) INFECTADAS POR  
*Toxoplasma gondii* REDUZ O PARASITISMO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado ao Instituto de Biologia (INBIO)  
da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)  
como parte das exigências para a obtenção do  
título de bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Parasitologia  
Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira  
Ferro  
Coorientador: Dr. Samuel Cota Teixeira

UBERLÂNDIA - MG

2020

Cheguei ao fim dessa jornada, após longos 5 anos, concluo uma das etapas mais importantes da minha vida e um dos maiores marcos da minha graduação: a entrega desse trabalho. Esse longo trajeto não seria possível sem o apoio da minha família, especialmente dos meus pais que abdicaram de suas vontades e sonhos para tornar isso real e possível, eles que sempre me apoiaram nos estudos e tentaram compreender minhas decisões, se orgulham de mim mesmo quando tudo que eu fazia não era compreendido. Assim, dedico este trabalho à minha mãe Karla Martins de Carvalho Luz e ao meu pai Sebastião Marcos da Luz, além do meu irmão, é claro, Marcus Arthur Carvalho Luz.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro que acreditou no meu potencial como aluna e me deu a honra de ser monitora na disciplina de Biologia Celular e Histologia, seguido de um convite para conhecer seu trabalho e linha de pesquisa no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução. Você é um grande exemplo de pessoa, professora e pesquisadora não só para mim, mas para toda a equipe do laboratório. Essa história começou graças a você, a quem sou extremamente grata por me envolver no mundo da pesquisa e me fazer apaixonar por essa área específica dentro desse tão vasto mundo biológico.

Agradeço também ao meu coorientador, Dr. Samuel Cota Teixeira, a quem serei eternamente grata. Obrigada pela paciência que teve em me ensinar tudo que era necessário para chegar até aqui, desde a cultura de células até aos experimentos finais e análise dos resultados, por me acompanhar em cada passo. Agradeço pela sua presença em todos os momentos. Obrigada pela confiança, pelas dicas e os momentos de descontração durante esse tempo juntos. Tenho muito carinho e admiração por você, que também é um grande exemplo para mim. Obrigada por tudo!

Não poderia deixar de agradecer a Iliana por ter me acolhido no primeiro momento em que entrei no laboratório e teve tanta paciência com o meu início. Obrigada Idessania por ter me coorientado durante a iniciação científica mesmo com todas as limitações e tempo corrido, você foi extremamente importante para minha trajetória. E por fim, obrigada Priscila por ter me acolhido, confiado, aconselhado, ajudado no momento em que me encontrava mais perdida sobre meu rumo no laboratório. Obrigada a todos os colegas de laboratório, mas em especial: Alessandra, Thádia e Guilherme por toda ajuda, paciência e amizade.

Deixo meus agradecimentos à Bateria Incendiária, por me proporcionar momentos de leveza e descontração. Ao PET Biologia UFU e todos os integrantes, foi essencial e uma oportunidade única minha passagem pelo grupo. Finalmente agradeço aos meus amigos de curso e de vida por estarem me acompanhando desde o começo, além de me apoiar: Ana Júlia Alvim, Ângelo Gervásio, Bethania Dias, Bianca Letícia, Larissa Martins, Maria Bethânia Oliveira, Maria Júlia Pacheco, Marianna Costa, Nathália Goulart, Rayssa Dalila, Vitoria Buzatto e Ysla Cardoso. Meus agradecimentos finais à uma pessoa especial: Wigor Lau, por ter passado esse ano tão difícil e conturbado ao meu lado, além de ter compreendido e me apoiado na finalização deste trabalho.

*“O importante é não parar de questionar, a curiosidade tem sua própria razão de existir”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* assume caráter grave em mulheres gestantes, causando a toxoplasmose congênita, a qual consiste na passagem transplacentária das formas taquizoítos do parasito. O tratamento é dificultado pela toxicidade apresentada pelos fármacos convencionais, por isso, outros compostos vêm sendo avaliados como tratamento alternativo para esta infecção. Plantas medicinais, bem como seus compostos bioativos isolados têm sido amplamente testados no combate a parasitoses humanas. Nesse contexto, trabalhos prévios têm demonstrado a importância de plantas do gênero *Copaifera* para o tratamento de doenças infecciosas parasitárias, como a doença de Chagas, leishmaniose e malária, entretanto, ainda existem poucos estudos que demonstre sua atividade antiparasitária contra *T. gondii*. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar a ação anti - *T. gondii* do óleo resina e do extrato etanólico das folhas de *Copaifera multijuga*. Para avaliar o efeito in vitro de *C. multijuga*, foi utilizado células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo), como modelo de célula hospedeira. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade do tratamento com óleo resina e o extrato etanólico em diferentes concentrações (256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4µg/mL) por meio dos ensaios de MTT. Nossos dados mostraram que apenas as maiores concentrações foram tóxicas para as células. Em seguida, as células BeWo foram infectadas e tratadas ou não com as concentrações não tóxicas de 64, 32, 16, 8 e 4µg/mL do óleo resina e 128, 64, 32, 16, 8 e 4µg/mL do extrato etanólico das folhas e o índice de proliferação intracelular do parasito foi analisado pelo ensaio de β-galactosidase. Como controle positivo de inibição do parasitismo, as células foram tratadas com a associação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PIR) (200+8µg/mL, respectivamente). Interessantemente, nossos resultados demonstraram que o óleo resina reduziu a proliferação intracelular do parasito nas maiores concentrações testadas, as quais foram mais eficientes quando comparado com SDZ + PIR. Por outro lado, o extrato etanólico não foi capaz de inibir o parasitismo nas doses avaliadas. Em seguida, demonstramos que o óleo resina na concentração de 64µg/mL inibiu a invasão parasitária, e manteve seu efeito antiproliferativo, até mesmo 24 horas após a remoção do tratamento. Assim, nossos resultados apontam para o potencial do óleo resina de *C. multijuga* como uma fonte alternativa para o tratamento da toxoplasmose congênita, por reduzir a taxa de proliferação de *T. gondii* com baixos efeitos de citotoxicidade para as células hospedeiras.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*. BeWo. *Copaifera multijuga*. Óleo resina. Toxoplasmose congênita.

## ABSTRACT

The infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* takes on a serious character in pregnant women, causing congenital toxoplasmosis, which consists of the transplacental passage of the tachyzoite forms of the parasite. Treatment is hampered by the toxicity presented by conventional drugs, so other compounds have been evaluated as an alternative treatment for this infection. Medicinal plants, as well as their isolated bioactive compounds, have been extensively tested to combat human parasites. In this context, previous studies have demonstrated the importance of plants of the genus *Copaifera* for the treatment of parasitic infectious diseases, such as Chagas disease, leishmaniasis and malaria; however, there are still few studies that demonstrate its antiparasitic activity against *T. gondii*. Therefore, the aim of this study was to investigate the action anti-*T. gondii* from resin oil and ethanolic extract from leaves of *Copaifera multijuga*. To evaluate the in vitro effect of *C. multijuga*, villous human trophoblastic cells (BeWo lineage) were used as a host cell model. Firstly, the cytotoxicity of the treatment with resin oil and the ethanolic extract in different concentrations (256, 128, 64, 32, 16, 8 and 4µg/mL) was evaluated using MTT assays. Our data showed that only the highest concentrations were toxic to the cells. Then, BeWo cells were infected and treated or not with the non-toxic concentrations of 64, 32, 16, 8 and 4µg/mL of the resin oil and 128, 64, 32, 16, 8 and 4µg/mL of the ethanolic extract of the leaves and the intracellular proliferation index of the parasite was analyzed by the β-galactosidase assay. As a positive control of parasitism inhibition, the cells were treated with the combination of sulfadiazine and pyrimethamine (SDZ + PIR) (200+8µg/mL, respectively). Interestingly, our results demonstrated that the resin oil reduced the intracellular proliferation of the parasite in the highest concentrations tested, which were more efficient when compared to SDZ + PIR. On the other hand, the ethanolic extract was not able to inhibit parasitism in the evaluated doses. Moreover, we demonstrated that the resin oil at a concentration of 64µg/mL inhibited parasitic invasion, and maintained its antiproliferative effect, even 24 hours after removal of the treatment. Thus, our results highlight the potential of *C. multijuga* resin oil as an alternative source for the treatment of congenital toxoplasmosis, by reducing the rate of *T. gondii* proliferation with low cytotoxic effects for host cells.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*. BeWo. *Copaifera multijuga*. Resin oil. Congenital toxoplasmosis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Aspectos taxonômicos, morfológicos e ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	8
1.2. Toxoplasmose e Toxoplasmose congênita: prevalência e sintomas	9
1.3. Resposta imunológica	11
1.4. Diagnóstico	13
1.5. Tratamento	14
1.6. Plantas medicinais com atividade antiparasitária	15
1.7. Gênero <i>Copaifera</i>	17
1.8. Linhagem de células trofoblásticas humana: BeWo	18
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1. Coleta do óleo resina e extrato etanólico de <i>Copaifera multijuga</i>	21
4.2. Cultivo de Células	21
4.3. Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i> em cultura	22
4.4. Viabilidade celular	22
4.5. Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i>	23
4.6. Ensaio de invasão de taquizoítos de <i>T. gondii</i> pré-tratados com óleo resina de <i>C. multijuga</i>	24
4.7. Ensaio de reversibilidade	24
4.8. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Óleo resina e o extrato etanólico das folhas de <i>C. multijuga</i> foram tóxicos para a célula BeWo apenas nas maiores concentrações	26
5.2. Óleo resina de <i>C. multijuga</i> reduz a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo	27
5.3. O pré-tratamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> com óleo resina inibe sua capacidade de invasão celular	28
5.4. O tratamento com óleo resina de <i>C. multijuga</i> apresentou um impacto irreversível na proliferação de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	29
5.5. Modelo proposto dos efeitos desencadeados pelo óleo resina de <i>C. multijuga</i> durante a infecção por <i>T. gondii</i> em células BeWo	30
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos taxonômicos, morfológicos e ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório capaz de infectar um amplo espectro de células nucleadas e tecidos de animais de sangue quente como aves e mamíferos (CARRUTHERS, 2002; DUBEY, 2010). *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiiida e família Sarcocystidae e foi identificado em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor na Tunísia, e por Splendore em um coelho no Brasil (DUBEY, 2010).

*T. gondii* é um organismo caracterizado pela presença do complexo apical formado por estruturas especializadas como o conóide, roptrias, micronemas, anel polar, grânulos densos e microtúbulos subpeliculares provenientes do citoesqueleto (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; BLADER; SAEIJ, 2009; JIMENEZ-RUIZ et al., 2016). Essas organelas citoplasmáticas garantem o processo de adesão e invasão celular (VENUGOPAL; MARION, 2018). O parasito invade a célula hospedeira realizando um movimento específico denominado “gliding”, o qual inicia-se com o posicionamento perpendicular de *T. gondii* em relação à superfície celular após o reconhecimento dos receptores de membrana da célula alvo (BLADER; SAEIJ, 2009). Após esse momento, há a liberação de moléculas adesivas denominadas MIC, as quais são secretadas pelas micronemas (CARRUTHERS, 2006; VENUGOPAL; MARION, 2018).

As roptrias também auxiliam no processo de invasão secretando suas proteínas, sendo importante para a formação do vacúolo parasitóforo (SOUZA et al., 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os grânulos densos liberam suas proteínas dentro do vacúolo parasitóforo, possibilitando que o parasito possa evadir das respostas da célula hospedeira (SOUZA et al., 2010). Além disso, as proteínas liberadas são importantes para a formação de túbulos especializados, possibilitando que o parasito possa competir com a célula hospedeira por metabólitos para a sua sobrevivência (MERCIER et al., 2005; CESBRON-DELAUW et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

Todas essas organelas são encontradas nas três formas infectantes do parasito: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos que apresentam morfologia variada (SOUZA et al., 2010). Os taquizoítos são conhecidos por sua proliferação rápida e encontram-se na fase aguda da doença, apresentam-se na forma de arco, banana ou meia-lua com uma das extremidades arredondada e a outra mais delgada, medindo aproximadamente 6µm de comprimento e 2µm de espessura (SOUZA et al., 2010).

Os bradizoítos estão presentes na fase crônica da infecção e morfologicamente assemelham-se com os taquizoítos (JEFFERS et al., 2018). Eles encontram-se no interior de cistos teciduais de lenta replicação que são altamente resistentes à ação do suco gástrico e do

sistema imunológico, podendo permanecer por longos períodos no organismo do hospedeiro. Contudo, em casos de imunossupressão, a infecção pode reativar-se, e os bradizoítos se convertem novamente em taquizoítos (JEFFERS et al., 2018).

Os esporozoítos encontram-se dentro de estruturas resistentes chamadas oocistos, os quais são formados no intestino do hospedeiro definitivo e liberados nas fezes ainda imaturos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Os oocistos perduram por muito tempo no ambiente devido à parede rígida formada por várias camadas, essa estrutura torna-se infectante quando em condições propícias sofre a esporulação e passam a ter dois esporocistos com quatro esporozoítos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

*T. gondii* apresenta ciclo de vida heteroxeno, ou seja, alternando entre hospedeiros intermediários e definitivos. Os felinos do gêneros *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos, as aves e os mamíferos, incluindo o homem, são os hospedeiros intermediários que podem adquirir o parasito pelo consumo de carnes cruas ou mal cozidas contendo cistos teciduais ou através da ingestão de água e vegetais contaminados com oocistos maduros (REY, 2001; NEVES, 2004; DUBEY et al., 2012; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Após a ingestão dos cistos ou oocistos há modificações que liberam bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente, penetrando o epitélio intestinal onde após alguns ciclos de reprodução rápida se diferenciam em taquizoítos que invadem ativamente vários tipos celulares do organismo, multiplicando-se rapidamente por endodiogenia (divisão assexuada na qual duas células-filhas são formadas dentro da célula-mãe), formando novos taquizoítos (fase proliferativa). Estes, por sua vez, irão romper a célula parasitada, ganhando a corrente sanguínea e invadirão novas células (MITSUKA-BREGANÓ; LOPES-MORI; NAVARRO, 2010; KAWAZOE; MINEO, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Os felinos, hospedeiros definitivos, também se infectam com a ingestão de cistos, que uma vez situados na mucosa gástrica liberam bradizoítos, estes migram para o epitélio intestinal e transformam-se em taquizoítos, onde se replicam por esquizogonia e formam esquizontes (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos. Estes merozoítos dão origem aos gametas, e havendo fecundação, formam-se oocistos. Após cair na luz intestinal, os oocistos são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

## **1.2. Toxoplasmose e Toxoplasmose congênita: prevalência e sintomas**

A toxoplasmose causada por *T. gondii* é uma das infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos (DUBEY, 2010). Estima-se que 30 a 50% da

população mundial esteja infectada pelo parasito (YAN et al., 2016; IMAM et al., 2017). A prevalência dessa protozoose pode variar de acordo com a região, sendo que na América do Norte, Sudoeste Asiático e Norte da Europa varia de 10 a 30%, enquanto em países da região central e sul da Europa a sorologia é de 30 a 50%. Na América Latina e países tropicais africanos a prevalência é alta, podendo variar de 30 a 90% (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; DUBEY et al., 2014). Essas diferenças são associadas com a alimentação, o preparo da comida, o tratamento adequado da água e a intensidade da exposição ambiental, hábitos culturais e fatores socioeconômicos (BOLAIS et al., 2017).

Os sintomas da toxoplasmose podem variar de acordo com o estágio da doença. Na fase aguda a disseminação é rápida e pode ser observada febre, dores musculares, dores de cabeça e alterações da visão devido à presença de parasitos na retina, além disso, há alta concentração de parasitos no sangue e, conseqüentemente, alto índice de disseminação pelo organismo. Esse estágio da doença pode ser perigoso para indivíduos imunodeficientes e durante a gestação para o feto (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; RORMAN et al., 2006). Em indivíduos imunocompetentes o sistema imunológico age forçando os taquizoítos a formar cistos com bradizoítos que representa a fase crônica da doença geralmente assintomática (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Um outro fator para a variação da sintomatologia da doença são as cepas, que podem ser mais ou menos virulentas (SIBLEY et al., 2009). Existem três linhagens clonais de *T. gondii*, a tipo I está, geralmente, associada a manifestações de doenças oculares graves, já a linhagem II é encontrada em casos de infecção crônica, infecção congênita e pacientes imunodeficiente, a cepa tipo III está presente em animais, e em humanos é normalmente assintomática (SIBLEY et al., 2009). Além dessas três linhagens clonais, vários estudos mostram que há uma grande diversidade de cepas que não pertencem a nenhuma dessas linhagens clonais (SIBLEY et al., 2009; KHAN et al., 2011; SU et al., 2012). Essas cepas atípicas são denominadas recombinantes ou exóticas e são encontradas principalmente na África e América do Sul e estão relacionadas tanto com toxoplasmose ocular quanto congênita (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; PETERSEN, 2007; RAJENDRAN; SU; DUBEY, 2012; BOTTÓS et al., 2009; BOUGHATTAS et al., 2011).

A toxoplasmose congênita é considerada uma das formas mais graves da doença, e ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítos, alcançando assim a circulação e os tecidos fetais (JEFFERS et al., 2018; STRANG et al., 2020). A incidência global de toxoplasmose congênita chega a cerca de 190 mil casos por ano (TORGERSON, MASTROIACOVO, 2013). No Brasil a prevalência da toxoplasmose congênita varia de 0,3 a

34 casos a cada 1000 nascidos vivos, dependendo da região (GONTIJO DA SILVA et al., 2015). Contudo, os índices de transmissão transplacentária e a gravidade dos danos fetais dependem do período gestacional (FALLAHI et al., 2018).

O risco de infecção fetal no primeiro trimestre é em torno de 10%, no entanto o comprometimento fetal é grave e pode levar ao aborto (FALLAHI et al., 2018). No segundo trimestre, as chances de transmissão aumentam para 30%, enquanto que no terceiro trimestre pode variar entre 60 a 90%, mas o comprometimento fetal é menor (DUNN et al., 1999; MCLEOD et al., 2009; GARCIA-MERIC et al., 2010). Os recém-nascidos que desenvolvem a toxoplasmose no terceiro trimestre gestacional apresentam-se fisicamente normais, mas correm o risco de apresentarem sintomas tardiamente como hepatoesplenomegalia, icterícia, danos neurológicos e oculares (JONES et al., 2003). Estima-se que 35% dos recém-nascidos diagnosticados com toxoplasmose congênita podem apresentar doenças neurológicas como hidrocefalia, microcefalia e retardo mental, 80% podem desenvolver lesões oculares e 40% perderem a audição (STRANG et al., 2020).

### 1.3. Resposta imunológica

A resposta imune contra *T. gondii* requer componentes da imunidade inata e adaptativa, envolvendo interações entre parasito, monócitos, linfócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células natural killers (NKs) (YAROVINSKY, 2014). As células da imunidade inata possuem receptores semelhantes a *Toll* (TLRs) que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), dando início a ativação do sistema imune (YAROVINSKY et al., 2005) desencadeando a produção de interleucina-12 (IL-12) por células dendríticas (YAROVINSKY; HIENY; SHER, 2008; MUKHOPADHYAY et al., 2020).

A síntese e liberação de IL-12 pelas células dendríticas, macrófagos e neutrófilos induz a síntese de interferon gama- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pelas células NKs (MILLER et al., 2009; HOU et al., 2011; MERCER et al., 2020). Adicionalmente, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) age juntamente com a IL-12, otimizando a produção de IFN- $\gamma$  por essas células (GAZZINELLI et al., 1993). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias está associada com a ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos TCD4<sup>+</sup> (perfil Th1) e TCD8<sup>+</sup>, que atuam produzindo e secretando diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), e proporcionando o aumento ainda maior nos níveis de IL-12 e IFN- $\gamma$  (MILLER et al., 2009; MELO et al., 2011a; ZHENG et al., 2019).

O IFN- $\gamma$ , por sua vez, ativa as células dendríticas, os macrófagos e os neutrófilos, promovendo a redução ou a eliminação do parasito (BUZONI-GATEL et al., 2006; NAST et

al., 2020). Quando os macrófagos são ativados pelo IFN- $\gamma$ , eles produzem óxido nítrico, permitindo uma ação tóxica contra o parasito, além disso, induz a produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito, o que implica na inibição da proliferação ou a destruição de *T. gondii* (PFEFFERKORN et al., 1986; MUKHOPADHYAY, SAEIJ, 2020). Além de participar da ativação clássica de macrófagos, o IFN- $\gamma$  favorece a conversão de taquizoítos em bradizoítos e impede também a reagudização da doença prevenindo o rompimento de cistos, uma vez que a alta produção de IFN- $\gamma$  no organismo amplia a resposta imune do hospedeiro ativando ainda mais as células de defesa (MILLER et al., 2009).

Para controlar a infecção por *T. gondii* também é necessária uma forte resposta imune mediada por células T *helper* 1 (Th1) (ARRANZ-SOLÍS et al., 2021). A produção de citocinas de perfil Th1 é efetiva, mas pode ser danosa ao hospedeiro devido à alta produção de IFN- $\gamma$  que lesa os tecidos infectados, assim, é estabelecido equilíbrio no perfil de resposta Th1 e Th2 mediado pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ 1, que atuam diminuindo a produção de NO em macrófagos, a atividade citotóxica de células NK e a maturação de células dendríticas. Além disso, as citocinas apresentam efeitos inibitórios sobre a síntese de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th1 (WILLE et al., 2001; SAKAGUCHI, 2005; AKBAR et al., 2007; MILLER et al., 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A imunidade humoral mediada por anticorpos também está associada ao controle da infecção por *T. gondii*, porém de maneira secundária (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). A classe de anticorpos IgM é a primeira a aparecer no início da infecção causada pelo parasito e são típicos da fase aguda. Já os anticorpos IgG são característicos da fase crônica da toxoplasmose, e suas funções incluem ativação da via clássica do sistema complemento e citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), quando receptores para a porção Fc de IgG estão presentes na superfície celular de macrófagos e células NK (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

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

#### 1.4. Diagnóstico

A toxoplasmose pode ser de difícil diagnóstico uma vez que é pouco sintomática e assemelha-se a outras doenças (FALLAHI et al., 2018). Embora não exista consenso sobre o real benefício do rastreamento universal para toxoplasmose na gravidez, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda a realização da triagem sorológica, principalmente em lugares onde a prevalência é elevada (BRASIL, 2013). O objetivo principal do rastreamento é a identificação de gestantes suscetíveis para acompanhamento durante a gestação, já que, a toxoplasmose congênita pode levar a sequelas graves (BRASIL, 2018). Assim, é importante confirmar as suspeitas clínicas com exames laboratoriais. Os testes mais comuns no diagnóstico da doença são os sorológicos e estes são baseados na presença dos anticorpos IgM e IgG e de antígenos na amostra coletada (FALLAHI et al., 2018).

Idealmente, a sorologia para toxoplasmose deve ser conhecida em mulheres previamente à concepção a fim de possibilitar o acompanhamento correto visando à prevenção da infecção. Já a detecção precoce objetiva prevenir a transmissão fetal e também proporcionar o tratamento, caso haja transmissão intrauterina (BRASIL, 2006; BRASIL 2018). Dentre os diversos exames feitos tem-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) que pode ser usado para identificar a fase aguda ou crônica e o teste de ELISA que apresenta maior sensibilidade podendo reconhecer anticorpos em baixa quantidade (EMELIA et al., 2014; TEIMOURI, 2020). O teste de avidéz é outro importante recurso que determina a época da infecção pelo toxoplasma na gestante, visto que alta avidéz indica que os anticorpos foram produzidos há mais de 12-16 semanas (MARQUES, 2015). Além do teste de avidéz, para confirmar toxoplasmose congênita pode-se coletar o líquido amniótico e realizar testes moleculares como PCR para a detecção do DNA do parasito (CAMILO, 2017; FALLAHI et al., 2018).

Há também a possibilidade de realizar pesquisa direta do parasito em amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, escarro, medula óssea, cortes de placenta, assim como dos conteúdos coletados de infiltrados cutâneos, de manifestações exantemáticas, do baço, do fígado, músculo e, especialmente de gânglios linfáticos (MITSUKA-BREGANÓ, 2010). No caso de recém nascido suspeito para toxoplasmose congênita, além da sorologia, deve ser submetido à investigação completa para o diagnóstico final, incluindo exame clínico e neurológico, exame oftalmológico completo com fundoscopia, exame de imagem cerebral (ecografia ou tomografia computadorizada), exames hematológicos e de função hepática (MARQUES, 2015).

## 1.5. Tratamento

Depois de diagnosticada a toxoplasmose, geralmente, o tratamento para indivíduos imunocompetentes não é necessário, sendo este recomendado principalmente na gravidez e em casos de pacientes com o sistema imunológico debilitado (PRADO et al., 2011). Dentre as drogas utilizadas atualmente no controle da toxoplasmose, temos a pirimetamina e a sulfadiazina que pertencem ao grupo dos antagonistas de folato e possuem efeito sinérgico (BELÁ, 2007; ALDAY, DOGGETT, 2017). Estas drogas são capazes de interromper o ciclo metabólico do parasito, através da inibição de enzimas como a dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), que participam da via da síntese de folato, importantes na formação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e consequente replicação do parasito (KADRI et al., 2014; SEPÚLVEDA-ARIAS; VELOZA; MANTILLA-MURIEL, 2014).

Apesar do tratamento convencional sugerido ser a combinação de pirimetamina e sulfadiazina (BRASIL, 2010), a associação destes fármacos é eficiente apenas na fase aguda e podem ser tóxicos a longo prazo (MONTROYA; REMINGTON, 2008). Os efeitos adversos relacionados com essas drogas incluem alterações hematológicas como anemia, trombocitopenia, leucopenia, reações de hipersensibilidade e também aumentam o risco de cálculos renais e complicações hepáticas, já que podem prejudicar a atividade da medula óssea (NASR et al., 2016; MONTAZERI et al., 2017).

Para mulheres grávidas, caso tenha ocorrido a transmissão vertical, o tratamento convencional de pirimetamina e sulfadiazina é recomendado apenas após o primeiro trimestre de gestação, devido à inibição da formação da medula óssea e sua natureza teratogênica (PETERS et al., 2007; KADRI et al., 2014; NASR et al., 2016). No intuito de prevenir os problemas hematológicos, o ácido fólico é adicionado ao tratamento com drogas antifolato (AMENDOEIRA; CAMILLO-COURA, 2010). Caso não tenha ocorrido a infecção fetal, o ideal é tratar com espiramicina que previne a transmissão vertical de *T. gondii* (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

Além disso, vários estudos independentes mostram que *T. gondii* possui um excepcional potencial adaptativo, o que têm levado ao desenvolvimento de parasitos resistentes à ação dos fármacos convencionalmente utilizados (MENECEUR, et al., 2008; SILVA, et al., 2017; MONTAZERI, et al., 2018). Acredita-se que a resistência aos fármacos contribua para falhas no tratamento que ocorrem em aproximadamente 10% dos pacientes durante a terapia inicial (ALDAY; DOGGETT, 2017). Dessa forma, devido a necessidade de tratamentos alternativos, estudos têm apontado espiramicina e azitromicina como drogas com potencial terapêutico



(RIBEIRO et al., 2017; ALDAY; DOGGETT, 2017). Estudos com nanopartículas também têm se mostrado fortes candidatos no combate à proliferação parasitária (COSTA et al., 2021).

Assim, diante do exposto sobre a toxicidade dos fármacos convencionais citados, da necessidade de buscar novas alternativas e dos vários estudos com compostos alternativos que vêm surgindo para terapêutica contra a toxoplasmose. Produtos naturais têm sido utilizados como base do desenvolvimento de novos fármacos, com o intuito de minimizar tais empecilhos e cada vez mais tem aumentado o interesse de estudiosos em explorar se essas plantas possuem atividades antiparasitárias significantes através de testes *in vitro* e *in vivo* (SEPÚLVEDA-ARIAS; VELOZA; MANTILLA-MURIEL, 2014; LEESOMBUN et al., 2016).

### **1.6. Plantas medicinais com atividade antiparasitária**

A importância das plantas medicinais têm sido revelada por estudos etnobotânicos realizados em diversas regiões no Brasil, uma vez que seu território abriga uma das floras mais ricas do planeta (GOTTLIEB et al., 1998; GOMES; BANDEIRA, 2012). Desde a antiguidade, as plantas medicinais são empregadas no tratamento e prevenção de enfermidades para proporcionar melhor qualidade de vida aumentando assim as chances de sobrevivência dos indivíduos (FIRMO et al., 2011).

De maneira geral, as plantas podem ser usadas na forma de chás, extratos brutos ou por meio de isolamentos de compostos ativos em preparações farmacológicas (RATES, 2001). Estima-se que 80% da população mundial faz uso dos recursos medicinais das plantas para suprir os serviços de saúde deficientes, principalmente em países subdesenvolvidos (FIRMO et al., 2011; FURTADO et al., 2018; DAMASCENO et al., 2019).

A comercialização dessas plantas no Brasil é feita principalmente em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais, consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, levando-se em consideração somente o conhecimento popular (RODRIGUES; AMARAL, 2012). Com isso, é de extrema importância a investigação e comprovação das propriedades biológicas para garantir a eficácia, segurança e qualidade das plantas em questão (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; FIRMO et al., 2011).

A validação da atividade de plantas pode ser realizada por meio de experimentos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Testes *in vitro* são realizados inicialmente, sendo uma etapa de triagem, permitindo a seleção de plantas que apresentam os melhores resultados (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Após a

obtenção desses resultados, prosseguem-se os testes *in vivo*, no qual são realizados em animais infectados experimentalmente, com objetivo de avaliar a eficácia e toxicidade das mesmas (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Um grande número de plantas com ação antiparasitária tem sido identificado e pesquisado tais como, *Cinchona officinalis* e *Artemisia annua* (Asteraceae), ambas usadas de base para o desenvolvimento de drogas antimaláricas (WEATHERS et al., 2014). *Curcuma* (Zingiberaceae) demonstra ter atividade contra *Trypanosoma* (HOET et al., 2004; HADDAD; SAUVAIN, DEHARO, 2011), *Baccharis retusa* (Asteraceae) e *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) exibem atividade antileishmanial (GRECCO et al., 2010).

Estudos realizados por Correia et al. (2016) demonstraram que o extrato diclorometanólico de folhas de *Myrciaria dúbia* apresenta compostos bioativos com ação contra os protozoários *P. falciparum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Adicionalmente, Figueredo et al. (2014) revelou que o extrato bruto etanólico e frações de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) possui atividade antiparasitária e citotóxica contra epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliensis*.

Extrato total de *Artemisia annua* *in vitro* e *in vivo*, demonstrou um potencial utilização no controle da infecção por *T. gondii* (OLIVEIRA, 2007). Estudos do mesmo autor em 2012 avaliaram os efeitos toxicológicos, anti-proliferativos, anti-inflamatórios e anti-toxoplásmicos do composto Timol, isolado da espécie *Lippia sidoides*, e do estragol, isolado da espécie *Croton zehntneri* e concluiu que ambos possuem importantes atividades biológicas e anti-*T. gondii* (OLIVEIRA, 2012).

Extratos secos ricos em 3-desoxantocianidinas das folhas vermelhas de *Sorghum bicolor* foram testados para atividade contra taquizoítos de *T. gondii*, e indicaram potente atividade inibitória *in vitro* contra a fase proliferativa de taquizoítos (ABUGRI et al., 2016). O óleo de *Nigella sativa* isolado e combinado com a pirimetamina foi comparado com a combinação clindamicina-pirimetamina, sendo observado que mesmo o óleo sozinho tendo propriedades antioxidantes e imunoestimulantes significativas, não foi capaz de reduzir a contagem de taquizoítos, por outro lado, a combinação do óleo com pirimetamina teve efeito sinérgico no tratamento da toxoplasmose (MADY et al., 2016).

Neste cenário, é relevante considerar compostos derivados de plantas como uma fonte de novas substâncias bioativas para o tratamento de doenças parasitárias, incluindo a toxoplasmose congênita. Nesse sentido, levando-se em consideração o impacto da toxoplasmose na população mundial e sua importância na saúde pública, torna-se pertinente a criação de novas alternativas terapêuticas para esta doença.

### 1.7. Gênero *Copaifera*

O gênero *Copaifera* foi descrito em 1942 por Symington e pertence à família Leguminosae (LLOYD, 1898; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). As espécies que compõem o gênero são conhecidas popularmente como copaíba, copaibeiras, pau d'óleo, entre outros nomes. Tem ocorrência na África, na América Central, sendo que a maioria das espécies, cerca de 37, são encontradas na América do Sul (LLOYD, 1898; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As espécies desse gênero podem ser arbustos ou árvores que chegam a atingir até 40 metros de altura, sendo possível extrair de seu tronco o óleo resina, o qual é empregado na medicina popular como anti-inflamatório e bactericida, dentre outros (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Tudo indica que o uso desse óleo veio da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaíbas. Os índios o utilizavam principalmente como cicatrizante e no umbigo de recém-nascidos para evitar o “mal-dos-sete-dias”. Os guerreiros quando voltavam de suas lutas untavam o corpo com o óleo da copaíba e se deitavam sobre esteiras suspensas e aquecidas para curar eventuais ferimentos (FERREIRA, 1999; LEITE, 2001).

O óleo resina de copaíba é uma substância natural composta de uma parte sólida resinosa não volátil formada por ácidos diterpênicos, responsável por 55 a 60% da sua constituição, a qual se encontra diluída em uma outra parte volátil, o óleo essencial, composto por sesquiterpenos (CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). A composição do óleo resina pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos de acordo com a espécie de copaíba (VEIGA JUNIOR, PINTO, MACIEL, 2005; ARRUDA et al., 2019). Estudos fitoquímicos mostraram que o óleo de *C. multijuga* apresentava a seguinte composição de ácidos graxos: ácido palmítico (24,9%); ácido oléico (35,3%); ácido linoleico (35,7%), ácido aráquico (1,1%); ácido beênico (3,0%) e cumarinas (0,2%) (CRAVEIRO et al., 1978).

Uma revisão feita por Teixeira e colaboradores (2020), abordou os aspectos gerais relacionados com a ação antiparasitária do óleo resina e componentes isolados presentes em diferentes espécies do gênero *Copaifera*. O presente estudo destacou que tanto o óleo resina quanto os compostos bioativos isolados apresentam eficiente atividade tripanocida, leishmanicida e antiplasmodial, principalmente por meio de uma ação direta sobre os parasitos ou pela modulação da resposta imune do hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2020). Um estudo realizado com *C. langsdorfii* avaliou a toxicidade materna e a teratogenicidade do seu óleo.

Neste estudo, foi observado que o óleo de *C. langsdorfii* administrado por via oral durante o período de organogênese da prenhez de camundongas não induziu toxicidade materna, nem causou teratogenicidade na prole das fêmeas tratadas, sugerindo a segurança do óleo durante o período gestacional (LOURENÇO et al., 2009).

Assim, considerando as informações supracitadas torna-se notório que o óleo resina de espécies do gênero *Copaifera* apresentam elevado potencial biológico. Nesse sentido, estudos que visem melhor compreender seus efeitos em outros parasitos como *T. gondii* têm se tornado alvos promissores.

### **1.8. Linhagem de células trofoblásticas humana: BeWo**

O trofoblasto é uma célula de origem fetal que possui uma diversidade de funções que propiciam o sucesso gestacional, sendo responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio receptivo, pela nutrição do embrião e por formar a porção fetal da placenta (FITZGERALD et al., 2008). Além disso, estas células participam efetivamente do diálogo na interface materno-fetal pela produção de citocinas e mediadores químicos (CHALLIS et al., 2009; BARBOSA et al., 2014).

Para melhor compreender o papel do trofoblasto no ambiente materno-fetal e, especialmente, na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando-se de linhagens celulares pré-estabelecidas. Por essa razão, como modelo de estudo de trofoblasto humano, o presente trabalho utilizou células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo), isoladas em 1968 por Pattillo e Gey, por manter muitas características típicas de trofoblasto humano ao secretar hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol (WOLFE, 2006).

## 1. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é um grave problema de saúde pública. Sabe-se que ainda não existem medicamentos capazes de curar completamente a doença, uma vez que estes atuam apenas na fase aguda da doença. Portanto, faz-se necessário o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas que visem controlar a transmissão vertical de *T. gondii* e diminuir os danos causados ao feto, uma vez que os medicamentos convencionais causam diversos efeitos colaterais, incluindo efeitos teratogênicos. De acordo com trabalhos prévios, foi observado que plantas medicinais, bem como seus compostos bioativos têm sido amplamente testados no combate a parasitoses humanas. Entretanto, ainda existem poucos estudos realizados com o gênero *Copaifera* principalmente, tratando-se de *Toxoplasma gondii*.

Assim, levando em consideração que células BeWo são linhagens celulares usadas como modelos de estudo do trofoblasto humano e que as plantas medicinais tem apresentado um significativo efeito protetor contra parasitos, o presente estudo se justifica por buscar estabelecer estratégias alternativas de tratamento para prevenir ou reduzir as taxas de transmissão vertical de *T. gondii*, ao avaliar a ação do óleo resina e extrato etanólico das folhas de *Copaifera multijuga* na susceptibilidade de células BeWo à infecção por *T. gondii*.

## 2. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação *in vitro* do óleo resina e do extrato etanólico das folhas de *Copaifera multijuga* em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) frente à infecção experimental pela cepa RH (clone 2F1) de *Toxoplasma gondii*.

### 3.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a citotoxicidade do óleo resina e extrato etanólico das folhas de *Copaifera multijuga* em células BeWo;
- b) Determinar o índice de proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH-2F1) em células BeWo tratadas ou não;
- c) Verificar o impacto do pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com o óleo resina na invasão celular;
- d) Analisar se o tratamento com óleo resina de *C. multijuga* possui um impacto reversível ou irreversível na proliferação intracelular de taquizoítos de *T. gondii*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Coleta do óleo resina e extrato etanólico de *Copaifera multijuga*

A amostra de óleo resina e extrato etanólico das folhas de *Copaifera multijuga* foram fornecidas pelo Professor Doutor Carlos Henrique Gomes Martins do Departamento de Microbiologia (DEMIC), Instituto de Ciências Biomédica (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A autorização para realizar estudos científicos com plantas espécies da biodiversidade brasileira foram solicitadas ao Conselho de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SIBIO/ICMBio/MMA/BRASIL) e Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA/BRASIL). As autorizações para realizar pesquisas com essas resinas foram emitidas sob os números 35143-1 e 010225/2014-5, respectivamente (SILVA et al., 2017).

O óleo resina e o extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* foram coletados na região Norte, no estado do Amazonas, cidade de Manacapuru. O óleo resina foi obtido através da perfuração dos troncos das árvores usando uma broca de 2", e os exsudatos retirados foram armazenados em garrafas de vidro. A amostra de óleo resina foi filtrada em filtro sintético de 25µm e armazenada a 15°C até sua utilização (SILVA et al., 2017). Todo o material vegetal coletado foi identificado por Silvane Tavares Rodrigues no Herbarium IAN (EMBRAPA Amazônia Oriental), Milton Groppo Junior no SPFR Herbarium (Universidade de São Paulo) ou Haroldo Cavalcante de Lima no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) por comparação direta com vales de herbário autênticos, de qual um certificado de identidade taxonômica está disponível mediante solicitação.

### 4.2. Cultivo de Células

Células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) foram adquiridas do "American Type Culture Collection" (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em cultura ou armazenadas adequadamente em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

Células BeWo foram cultivadas em frascos de 25cm<sup>2</sup> ou 75cm<sup>2</sup> contendo meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e antibióticos (10.000U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (BARBOSA et al., 2014). De acordo com o Comunicado N°13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP) declara que projetos de pesquisa que

envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo I).

#### 4.3. Manutenção da cepa RH de *T. gondii* em cultura

Taquizoítos da cepa RH (clone 2F1) de *T. gondii*, expressando a enzima  $\beta$ -galactosidase, foram cedidos pelo professor Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Taquizoítos de *T. gondii* foram mantidos nas células BeWo cultivadas em meio RPMI 2% SFB a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (BARBOSA et al., 2014).

#### 4.4. Viabilidade celular

A viabilidade das células BeWo frente aos tratamentos com *C. multijuga* (óleo resina e extrato etanólico das folhas) foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Sempre, previamente à realização dos tratamentos, o óleo resina e o extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* foram solubilizados em dimetil sulfóxido (DMSO) e diluídos em meio RPMI 10% SFB para formar uma solução estoque de 640 $\mu$ g/mL (VIEIRA, et al., 2018; FURTADO, et al., 2018). Em resumo, células BeWo (3x10<sup>4</sup> células/poço) foram plaqueadas em 200 $\mu$ L de meio RPMI 10% SFB em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram tratadas em diluição seriada (1:2) com concentrações decrescentes de óleo resina ou extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* (256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu$ g/mL) durante 24 horas.

Para verificar se o DMSO poderia ser tóxico para as células, estas foram tratadas com 1,2% e 0,6% de DMSO em meio RPMI, o que corresponde à concentração de DMSO presente nas duas maiores concentrações que foram testadas (256 e 128 $\mu$ g/mL). Como controle positivo de viabilidade, células BeWo foram tratadas somente com meio RPMI 10% SFB. O presente trabalho utilizou a associação entre sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PIR), drogas clássicas no tratamento da toxoplasmose congênita, como padrão-ouro para avaliar o efeito das amostras vegetais de *C. multijuga* (DA SILVA et al., 2017). Por essa razão, as células também foram incubadas com 200 +8 $\mu$ g/mL de sulfadiazina e pirimetamina, respectivamente.

Após 24 horas de tratamento, as células foram incubadas com 10 $\mu$ L de MTT (5mg/mL) acrescido de 90 $\mu$ L de meio RPMI 10% SFB em estufa durante 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 $\mu$ L de solução contendo SDS 10% e N, N-dimetil formamida 50% (MOSMANN, 1983). Após 30



minutos de incubação, foi feita a leitura da densidade óptica (DO) a 570nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) e os resultados foram expressos como porcentagem (%) de células viáveis (viabilidade celular) em relação ao controle tratado apenas com meio de cultura, sendo considerado como 100% de viabilidade celular.

#### 4.5. Proliferação intracelular de *T. gondii*

Após avaliar a citotoxicidade do óleo resina e extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* pelo ensaio do MTT em células BeWo, foi avaliada a proliferação intracelular de *T. gondii* nestas células. Células BeWo ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em 200 $\mu$ L de meio RPMI 10% SFB em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção de 3 parasito por célula (3:1) em meio RPMI 10% SFB. Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas com meio de cultura incompleto (sem SFB), para remoção dos parasitos extracelulares, e tratadas ou não em diluição seriada (1:2) com concentrações não citotóxicas do óleo resina (64, 32, 16, 8 e 4 $\mu$ g/mL) ou extrato etanólico das folhas (128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu$ g/mL) de *C. multijuga* durante 24 horas. Adicionalmente, células BeWo infectadas também foram tratadas com SDZ + PIR (200+8 $\mu$ g/mL, respectivamente). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de  $\beta$ -galactosidase (BARBOSA et al., 2014). O ensaio se baseia na clivagem do substrato CPRG (Clorofenol vermelho- $\beta$ -DGalactopiranosídeo) pela enzima  $\beta$ -galactosidase, levando a formação de galactose e do cromóforo vermelho de clorofenol, de coloração avermelhada que é detectável por espectrofotometria a 570 nm (TONINI, 2013).

Após as 24 horas de tratamento, as placas foram centrifugadas, e em seguida foi adicionado 100 $\mu$ L de tampão de lise RIPA por poço [50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio e 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7.5] por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 160 $\mu$ L de tampão de ensaio (100mM de tampão fosfato, pH 7,3, 102mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 9mM de MgCl<sub>2</sub>) e 40 $\mu$ L do substrato CPRG (clorofenol red- $\beta$ -D-galactopiranosídeo; Roche). Por fim, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase foi mensurada a 570nm usando leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLan, VA, EUA).

A proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítos) foi obtida de acordo com uma curva de referência contendo taquizoítos livres (de  $1 \times 10^6$  a  $15,625 \times 10^3$ ). Os dados foram expressos como porcentagem (%) da proliferação de *T. gondii*, onde a média do número de taquizoítos do controle positivo de crescimento do parasito (células infectadas e não tratadas)

corresponde a 100% de proliferação parasitária. A eficiência de cada condição de tratamento foi mensurada em comparação com o controle positivo (100% proliferação de parasitos) (TEIXEIRA, et al., 2020).

#### **4.6. Ensaio de invasão de taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com óleo resina de *C. multijuga***

Células BeWo ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em 200 $\mu$ L de meio RPMI 10% SFB em placas de cultura de 96 poços. Em seguida, taquizoítos derivados de cultura de células infectadas com *T. gondii* em uma proporção 3:1 foram pré-incubados por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com 64, 32 e 16 $\mu$ g/mL do óleo resina de *C. multijuga*, doses essas que foram capazes de inibir a proliferação intracelular do parasito. Nas mesmas condições, parasitos também foram pré-incubados com SDZ + PIR (200 + 8 $\mu$ g/mL) ou apenas com meio de cultura (grupo não tratado). Em seguida, os parasitos foram centrifugados a 2000 rotações por minuto (RPM) em temperatura ambiente por cerca de 7 minutos, com o objetivo de remover o excesso de tratamento. O pellet foi ressuspendido em meio RPMI 10% SFB (livre de tratamentos) e só então as células foram infectadas por 3 horas, na proporção de 3:1. Após o tempo de infecção, as células foram lavadas sucessivas vezes com meio RPMI incompleto para remoção do excesso de parasitos extracelulares (não internalizados). Por fim, a taxa de invasão de taquizoítos de *T. gondii* foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de  $\beta$ -galactosidase, como descrito anteriormente.

#### **4.7. Ensaio de reversibilidade**

Células BeWo ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em 200 $\mu$ L de meio RPMI 10% SFB em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção de 3:1 em meio RPMI 10% SFB. Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas com meio de cultura RPMI incompleto (sem SFB) para remover os parasitos não internalizados. Em seguida, usamos o seguinte esquema para testarmos duas condições experimentais:

- a) Os parasitos internalizados (após 3 horas de invasão) puderam crescer na presença do óleo resina (64, 32 e 16 $\mu$ g/mL) de *C. multijuga*, SDZ + PIR (200 + 8  $\mu$ g/mL) ou meio de cultura apenas (grupo não tratado) por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
- b) Em outra condição, os parasitos internalizados foram cultivados nas mesmas condições dos tratamentos (conforme citado acima no item I), porém após 24 horas

de tratamento, as células foram lavadas, o meio substituído por RPMI 10% SFB, e os parasitos cresceram por mais 24 horas na ausência de tratamento.

Em ambas as situações, quantificamos a proliferação intracelular de *T. gondii* usando o ensaio de  $\beta$ -galactosidase, conforme mencionado anteriormente. Finalmente, medimos a taxa de reversibilidade em porcentagem (reversibilidade do tratamento %) em 24 horas após a remoção do tratamento em comparação com o grupo não tratado (considerado como 100% de reversibilidade) e a condição de tratamento correspondente em 24 horas de tratamento (linha de base para comparação).

#### **4.8. Análise estatística**

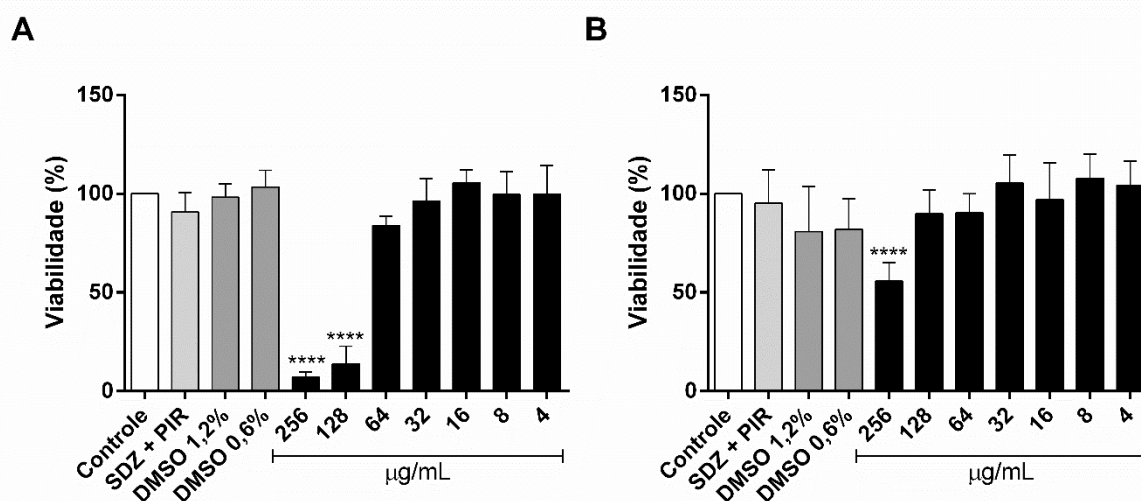
Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os dados obtidos foram submetidos à teste de normalidade, sendo que quando paramétricos, foram posteriormente analisados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste por comparações múltiplas de Tukey ou Sidak, e quando não paramétricos, isto é, não validados via teste de normalidade, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste por comparações múltiplas de Dunn, utilizando o programa GraphPad Prism® Version 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Óleo resina e o extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* foram tóxicos para a célula BeWo apenas nas maiores concentrações

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de avaliar a possível citotoxicidade do óleo resina e do extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* testadas em células BeWo nas diferentes concentrações (256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24 horas, nós observamos que o tratamento com óleo resina reduziu significativamente a viabilidade celular apenas nas concentrações de 256 e 128  $\mu\text{g/mL}$  quando comparado com o controle (células não tratadas) (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 1A**). Já o extrato etanólico das folhas reduziu a viabilidade das células apenas na concentração de 256  $\mu\text{g/mL}$  se comparado com o controle (células não tratadas) (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 1B**). Além disso, nós observamos que o diluente utilizado, o DMSO, nas concentrações de 1,2% e 0,6%, não foi capaz de diminuir a viabilidade das células em relação as células não tratadas (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 1A, B**). Quando células BeWo foram tratadas com a associação de sulfadiazina e pirimetamina (200+8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) não foi observada redução da viabilidade celular quando comparado com células não tratadas (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 1A, B**).

FIGURA 1 – VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

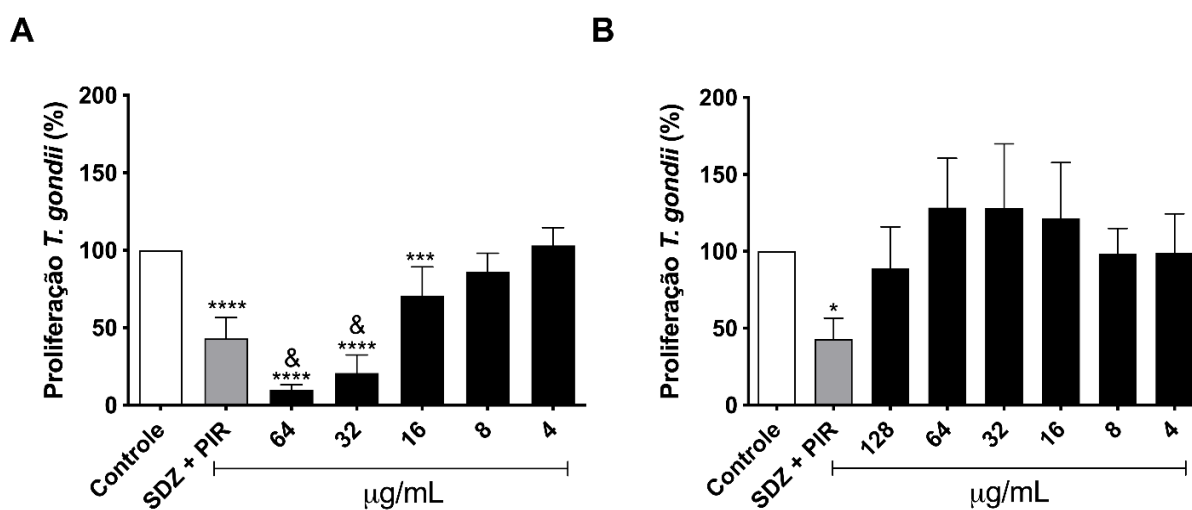


Células BeWo foram tratadas por 24 horas em diluições seriadas (variando de 256 a 4  $\mu\text{g/mL}$ ) com **A**) óleo resina e **B**) extrato etanólico das folhas de *C. multijuga*. Em relação aos controles experimentais, células BeWo também foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle), sulfadiazina + pirimetamina (200+8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e DMSO 1,2% e 0,6% (porcentagem do veículo de diluição das amostras nas concentrações de 256 e 128  $\mu\text{g/mL}$ ). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem (Viabilidade %), com a absorbância das células incubadas apenas com o meio de cultura considerado 100% de viabilidade. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). \*Comparação entre células não tratadas (controle) e células tratadas. Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Sidak. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

## 5.2. Óleo resina de *C. multijuga* reduz a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

Células BeWo foram infectadas, e após 3 horas foram tratadas em diluições seriadas (1:2) por 24 horas com concentrações não citotóxicas do óleo resina (64, 32, 16, 8 e 4  $\mu\text{g/mL}$ ) ou extrato etanólico das folhas (128, 64, 32, 16, 8 e 4  $\mu\text{g/mL}$ ) de *C. multijuga*. A porcentagem de proliferação do parasito (Proliferação *T. gondii* %) foi determinada pela quantificação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Observamos que o tratamento com óleo resina apresentou uma redução significativa na proliferação intracelular de *T. gondii* nas concentrações de 64, 32 e 16  $\mu\text{g/mL}$  quando comparado com as células infectadas e não tratadas (controle) (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 2A**). Interessantemente, nossos resultados demonstraram que o tratamento com óleo resina nas concentrações de 64 e 32  $\mu\text{g/mL}$  foi mais eficiente na inibição da proliferação dos parasitos, quando comparado com o tratamento convencional de SDZ + PIR (& $P < 0,05$ ) (**Figura 2A**). A combinação SDZ + PIR (200+8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) também foi capaz de reduzir a replicação do parasito em comparação com o grupo controle (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 2A, B**). Além disso, nossos resultados demonstraram que o tratamento com o extrato etanólico da folha de *C. multijuga* não foi capaz de inibir a proliferação intracelular de *T. gondii* nas concentrações testadas (**Figura 2B**). Uma vez que, o extrato etanólico das folhas não apresentou resultados significativos na inibição da proliferação parasitária, os próximos ensaios foram realizados apenas com o óleo resina.

FIGURA 2 – QUANTIFICAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS INTRACELULARES DE *T. gondii* PELA REAÇÃO ENZIMÁTICA DA ATIVIDADE DA  $\beta$ -GALACTOSIDASE

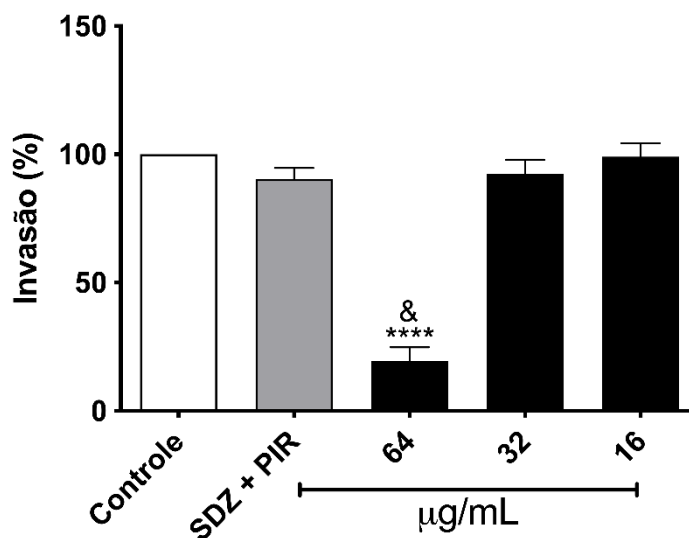


Células BeWo infectadas por *T. gondii* foram tratadas por 24 horas em diluição seriada com **A**) óleo resina (variando de 64 a 4µg/mL) e **B**) extrato etanólico das folhas (variando de 128 a 4µg/mL) de *C. multijuga*. Com relação aos controles experimentais, células BeWo infectadas foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle - considerado como 100% de proliferação dos parasitos) e com a combinação SDZ + PIR (200+ 8µg/mL, respectivamente). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de β-galactosidase e a proliferação intracelular foi expressa em porcentagem (Proliferação *T. gondii* %). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). \*Comparação entre células infectadas/não tratadas e células infectadas/tratadas. &Comparação com o tratamento convencional de SDZ + PIR. Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

### 5.3. O pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com óleo resina inibe sua capacidade de invasão celular

Para avaliar o impacto do tratamento com óleo resina de *C. multijuga* na invasão celular, taquizoítos de *T. gondii* foram previamente tratados ou não por 1 hora com óleo resina (64, 32 e 16µg/mL). Após, os parasitos foram lavados e incubados com as células BeWo por 3 horas (tempo de invasão), e em seguida realizamos o ensaio de β-galactosidase. Observamos que o pré-tratamento dos parasitos com o óleo resina apresentou redução significativa na invasão de *T. gondii* apenas na concentração de 64µg/mL, quando comparado com o grupo no qual os parasitos foram incubados apenas com meio de cultura (grupo controle) (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 3**). Além disso, nossos resultados revelaram que a concentração de 64µg/mL foi mais eficiente na inibição da invasão, quando comparado com o tratamento convencional de SDZ + PIR (& $P < 0,05$ ) (**Figura 3**). Curiosamente, o pré-tratamento com SDZ + PIR não foi capaz de inibir a invasão do parasito em células BeWo (**Figura 3**).

FIGURA 3 – INVASÃO DE TAQUIZOÍTO DE *T. gondii* PRÉ-TRATADOS EM CÉLULAS BEWO



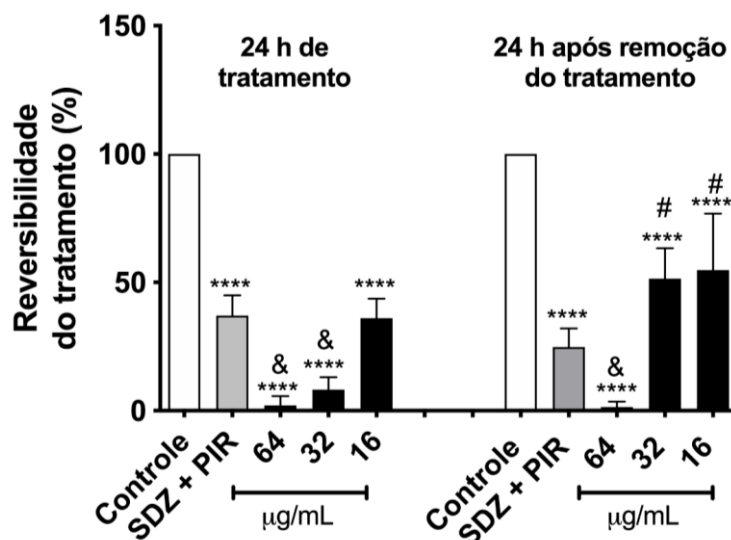
Taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 hora com 64, 32 e 16µg/mL do óleo resina de *C. multijuga*, SDZ + PIR (200+8µg/mL) e meio de cultura (controle). A porcentagem de invasão de *T. gondii* (Invasão %) foi determinada usando o teste de β-galactosidase, em que os parasitos não tratados (controle) foram considerados 100% de invasão. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). \*Comparação entre parasitos não tratados (controle) e parasitos tratados. &Comparação em relação aos parasitos tratados com SDZ + PIR. Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

#### **5.4. O tratamento com óleo resina de *C. multijuga* apresentou um impacto irreversível na proliferação de taquizoítos de *T. gondii***

Para avaliarmos se os efeitos antiparasitários promovidos pelo óleo resina de *C. multijuga* era reversível, células BeWo infectadas pelo parasito foram tratadas com o óleo resina (64, 32 e 16µg/mL) por 24 horas. Após, as monocamadas celulares foram cuidadosamente lavadas para remover os tratamentos e depois incubadas em meio sem tratamento por mais 24 horas. Paralelamente, determinou-se a proliferação dos parasitos às 24 horas de tratamento com o óleo resina para servir como linha de base para comparação. Como visto anteriormente no ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* (**Figura 2A**), também observamos a redução significativa da proliferação parasitária nas concentrações de 64, 32 e 16µg/mL e no tratamento com SDZ + PIR em comparação com o grupo controle em 24 horas de tratamento (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 4**). Além disso, as concentrações de 64 e 32µg/mL se mostraram mais potentes no controle da redução paritária se comparado com o tratamento convencional de SDZ + PIR com 24 horas de tratamento (& $P < 0,05$ ) (**Figura 4**).

Com 24 horas após a remoção do tratamento, foi possível observar que a proliferação intracelular de *T. gondii* voltou a aumentar nas concentrações de 32 e 16µg/mL quando comparado com a respectiva concentração na condição de 24 horas de tratamento (# $P < 0,05$ ); contudo, apesar da recuperação da proliferação intracelular, a porcentagem de parasitos foi significativamente menor em ambas as concentrações, quando comparado com o controle (\* $P < 0,05$ ) (**Figura 4**). Interessantemente, a concentração de 64µg/mL e o tratamento com SDZ + PIR mantiveram o seu efeito antiproliferativo após a remoção dos tratamentos, uma vez que não houve diferença estatística quando comparado com a respectiva condição em 24 horas de tratamento (**Figura 4**). Por fim, o efeito antiproliferativo do óleo resina na concentração de 64µg/mL, mesmo 24 horas após sua remoção, se manteve mais eficiente em controlar o crescimento do parasito, quando comparado com o tratamento clássico de SDZ + PIR (& $P < 0,05$ ) (**Figura 4**).

FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DOS EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS DO ÓLEO RESINA DE *C. multijuga* PELO ENSAIO DE REVERSIBILIDADE



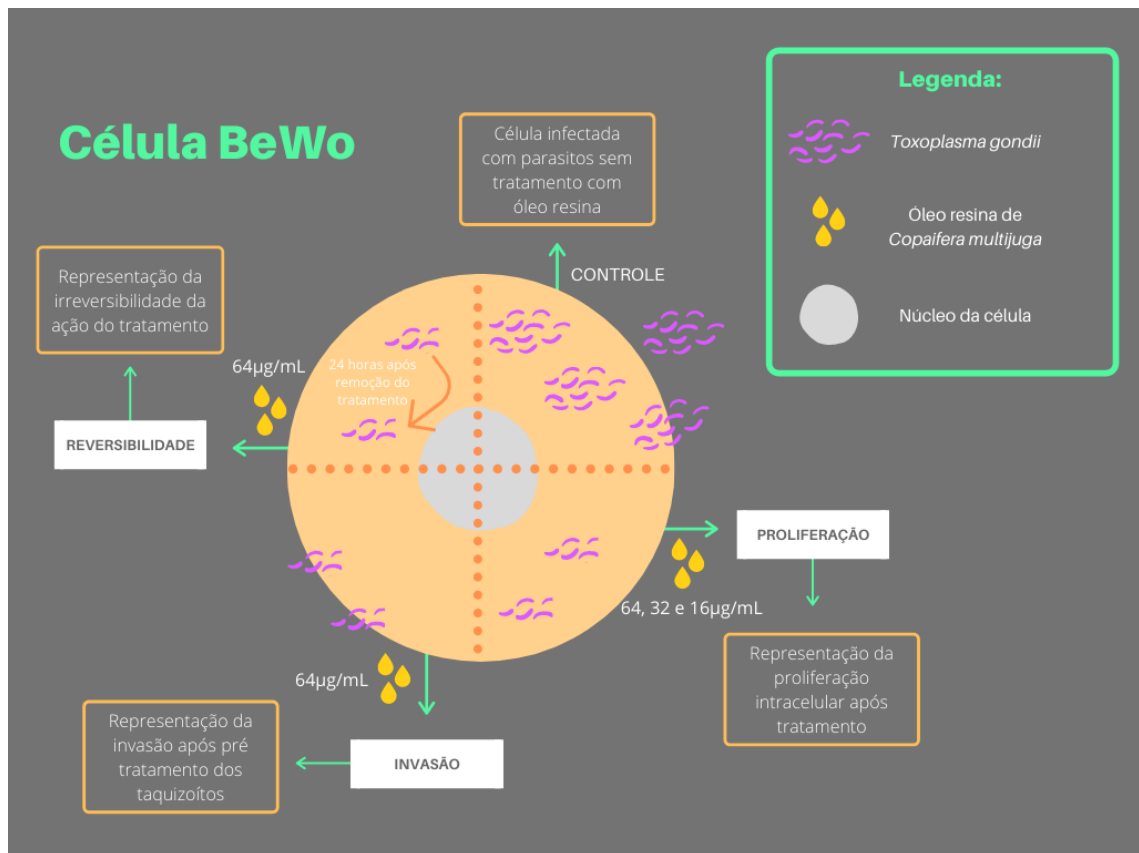
As células BeWo infectadas com *T. gondii* foram tratadas com a 64, 32 e 16µg/mL do óleo resina de *C. multijuga*, SDZ + PIR (200+8µg/mL) e apenas meio de cultura (controle) por 24 horas, seguido pela remoção do tratamento por mais 24 horas. A proliferação dos parasitos com 24 horas de tratamento foi determinada para servir como linha de base para a comparação. A taxa de reversibilidade em porcentagem (Reversibilidade do tratamento %) foi determinada usando o teste de  $\beta$ -galactosidase para comparar e avaliar a capacidade dos parasitos de se recuperarem do tratamento, onde grupo controle foi considerado como 100% de reversibilidade. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). \*Comparação entre células infectadas/não tratadas e células infectadas/tratadas. &Comparação com o tratamento convencional de SDZ + PIR. #Comparação com o respectivo tratamento na condição de 24 horas de tratamento. Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

### 5.5. Modelo proposto dos efeitos desencadeados pelo óleo resina de *C. multijuga* durante a infecção por *T. gondii* em células BeWo

Com base em nossos resultados, propomos um modelo para exemplificar o mecanismo de ação do óleo resina de *C. multijuga* contra *T. gondii* em células BeWo comparado com nosso controle que não recebeu tratamento (**Figura 5**). Nossos dados mostraram que o tratamento com óleo resina de *C. multijuga* foi capaz de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo. Além disso, o pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* apresentou capacidade em reduzir a invasão do parasito nas células e, além disso, exibiu uma ação irreversível antiparasitária dependente da concentração.



FIGURA 5 – MODELO REPRESENTATIVO DO EFEITO DO ÓLEO RESINA DE *C. multijuga* EM CÉLULAS BEWO INFECTADAS COM *T. gondii*



Fonte: O autor (2020)

A imagem foi construída baseado nos experimentos realizados em nosso trabalho como forma de resumir os efeitos causados pelo tratamento com o óleo resina de *C. multijuga*. Representados em setores, cada quadrante indica uma metodologia desenvolvida em sentido horário, sendo o primeiro uma representação do controle que usamos como base de comparação para os demais resultados.

## 6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da infecção causada por *T. gondii* (CARLIER et al., 2012; OZ, 2014a). A transmissão vertical do parasito pode desencadear aborto ou complicações para o feto, como malformações, problemas neurológicos e oculares (OLARIU et al., 2011; KIEFFER; WALLON, 2013; LI et al., 2014). A resposta imune contra *T. gondii* é uma resposta tipicamente celular (GAZZINELLI et al., 1994), no entanto, esta resposta não é capaz de erradicar completamente o parasitismo, dessa maneira o uso de medicamentos é essencial para controlar a infecção em algumas circunstâncias, especialmente em pacientes imunocomprometidos, gestantes infectadas e em crianças infectadas congenitamente.

Neste cenário, produtos naturais estão sendo amplamente utilizados como tratamentos alternativos para várias doenças parasitárias e alguns demonstraram efeitos promissores contra *T. gondii in vitro* e *in vivo*, além de poderem potencialmente diminuir os efeitos colaterais dos medicamentos de uso padrão no tratamento da toxoplasmose congênita (SHARIF, et al., 2016; SEPULVEDA-ARIAS, et al., 2017). Existem vários estudos que demonstraram os efeitos antiparasitários do óleo resina obtido de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (SANTOS et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2012; IZUMIL et al., 2012). Nesse sentido, o presente estudo investigou os efeitos do óleo resina e do extrato etanólico da folha de *C. multijuga* no controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo), consideradas excelentes modelos experimentais para o estudo da toxoplasmose congênita *in vitro* (BARBOSA et al., 2014; CASTRO-FILICE et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

Inicialmente, para investigar o impacto do óleo resina e do extrato etanólico da folha de *C. multijuga* em células BeWo, verificamos primeiramente a viabilidade das células tratadas com diferentes concentrações. O ensaio de MTT foi realizado para determinar as melhores concentrações que não alterassem significativamente a viabilidade das células. Nossos resultados mostraram que, células BeWo tratadas com o óleo resina e extrato etanólico exibiram viabilidade celular alterada apenas nas concentrações mais altas. Um estudo realizado por Gonçalves (2014) visando avaliar a segurança do uso do óleo de *Copaifera multijuga* mostrou que a administração diária por via oral em ratos Wistar não produziu morte ou modificação do padrão comportamental dos animais. O trabalho de Teixeira e colaboradores (2020) também testou a toxicidade de espécies diferentes de *Copaifera* em diferentes concentrações e observou a não toxicidade dos óleos.

Em seguida, tratamos as células BeWo infectadas com *T. gondii* por 24 horas com diferentes concentrações não tóxicas do óleo resina e extrato etanólico das folhas de *C. multijuga*. Observamos que o óleo resina de *C. multijuga* foi tão capaz quanto o tratamento com SDZ + PIR para reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo. Interessantemente, o óleo resina nas concentrações mais altas mostrou-se mais efetivo no controle da proliferação intracelular dos parasitos do que o tratamento convencional com SDZ + PIR. Entretanto, o extrato etanólico das folhas de *C. multijuga* não se mostrou eficiente no controle da proliferação.

Assim, devido à maior eficiência e possível seletividade apresentada pelo óleo resina, nos próximos ensaios foram adotados os valores de 16, 32 e 64µg/mL, correspondentes às concentrações que se mostraram mais eficientes no controle do parasitismo. Interessantemente, de acordo com o ensaio de viabilidade celular, essas três concentrações do óleo não apresentaram diminuição da viabilidade celular.

*T. gondii* é um parasito protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar uma ampla gama de células nucleadas (DUBEY, 2010). Assim, o sucesso no estabelecimento da infecção exige a habilidade dos parasitos em aderir, invadir e proliferar dentro da célula hospedeira (HALL et al., 2011; ADEYEMI et al., 2017). Assim, levantamos a seguinte questão: o pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com o óleo resina de *C. multijuga* seria capaz de interferir em processos fundamentais para invasão celular? Nossos dados revelaram que o pré-tratamento de taquizoítos por 1 hora com o óleo resina foi capaz de reduzir a porcentagem de invasão dos parasitos na célula hospedeira apenas na maior concentração testada (64µg/mL). Interessantemente, o pré-tratamento dos parasitos com SDZ + PIR não alterou a invasão celular.

Nesse sentido, observamos que o tratamento com óleo resina das células BeWo infectadas com *T. gondii* e o pré-tratamento parecem afetar os parasitos de forma a inibir sua proliferação bem como sua invasão, respectivamente. Assim, sugerimos que o tratamento com o óleo resina tenha uma possível ação direta sobre os parasitos, interferindo em funções essenciais para sua sobrevivência. Esta hipótese é parcialmente suportada pelo ensaio de reversibilidade. Aqui, demonstramos que, após 24 horas de tratamento, quando o tratamento com o óleo resina na maior concentração foi removido, os parasitos não recuperaram sua capacidade de proliferação, evidenciando que o óleo resina foi capaz de promover um possível dano nos parasitos, o que comprometeu a capacidade de recuperação da proliferação, mesmo após a remoção do tratamento. Similarmente, o tratamento com SDZ + PIR também promoveu um efeito irreversível na proliferação dos parasitos. Contudo, nossos dados sugerem que a ação

do óleo resina na concentração de 64µg/mL foi mais eficiente para bloquear a recuperação do crescimento do parasito do que o tratamento com SDZ + PIR.

Em resumo, visto que óleos e extratos botânicos têm sido amplamente usados no tratamento de várias doenças e apresentam resultados positivos, escolhemos o óleo resina de *C. multijuga* para avaliar sua eficiência no combate a *T. gondii*. Levantamos a hipótese de que compostos presentes no óleo resina de *C. multijuga* sejam capazes de afetar diretamente os parasitos extracelulares e também os intracelulares, já que provavelmente o composto é capaz de atravessar a membrana celular do hospedeiro para alcançar os parasitos. O gênero *Copaifera* spp. já revela resultados positivos no tratamento de outras parasitoses e estudos realizados por outros autores reforçam nossa teoria. Izumil e colaboradores (2013) testaram a atividade antiparasitária do óleo resina de 8 espécies diferentes de *Copaifera* contra *Trypanosoma cruzi* e todas os óleos de copaíba exerceram efeitos em todos os estágios da vida do parasito, principalmente contra as formas replicativas. O óleo resina de *C. reticulata* foi testado em modelos *in vitro* e *in vivo* e apresentou potencial antimalárico (DE SOUZA et al., 2016). Os efeitos do óleo resina de *C. paupera* foram avaliados *in vitro* em cepas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* e exibiram alta atividade leishmanicida (RODRIGUES et al., 2018).

Um estudo realizado recentemente por Teixeira e colaboradores (2020), investigou os efeitos antiparasitários do óleo resina de diferentes espécies do gênero *Copaifera* contra *T. gondii*. Os óleos resinas de *C. reticulata*, *C. duckei*, *C. paupera* e *C. pubiflora* foram usadas para tratar células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo) e explantes vilosos humanos de terceiro trimestre gestacional infectados com *T. gondii*. Os resultados demonstraram que os óleos resinas foram capazes de reduzir a proliferação, adesão e invasão intracelular do parasito, além de que foi observada uma ação antiparasitária irreversível dependente da concentração nas células BeWo infectadas. Resultados estes que foram vistos semelhantemente em nossos resultados com *Copaifera multijuga*. Assim, nosso estudo sugere que o óleo resina de *C. multijuga* é um composto promissor a ser utilizado no tratamento contra *T. gondii*, entretanto mais estudos precisam ser realizados para constatar e compreender de forma mais esclarecedora como esse óleo atua nos parasitos e células do organismo.

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados do nosso trabalho, concluímos que o óleo resina de *Copaifera multijuga* foi eficaz no controle da proliferação e invasão de *T. gondii* em concentrações não tóxicas para a célula BeWo. Além disso, o óleo resina teve impacto irreversível na proliferação intracelular de taquizoítos de *T. gondii* mostrando-se como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de toxoplasmose congênita.

## REFERÊNCIAS

- ABUGRI, D. A.; WITOLA, W. H.; JAYMES, J. M.; TOUFIC, N. In vitro activity of Sorghum bicolor extracts, 3-deoxyanthocyanidins, against *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**. [s. l.], v. 164, p. 12-19, 2016.
- ADEYEMI, O. S.; MURATA, Y.; SUGI, T.; KATO, K. Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. **International journal of nanomedicine**. [s. l.], v. 12, p. 1647-1661, 2017.
- AKBAR, A. N.; VUKMANOVIC-STEJIC, M.; TAAMS, L. S.; MACALLAN, D. C. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. **Nature Reviews Immunology**. [s. l.], v. 7, p. 231-37, 2007.
- ALDAY, P. H.; DOGGETT, J. S. Drugs development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. **Drug Design, Development and Therapy**. [s. l.], v. 11, p. 273-293, 2017.
- AMENDOEIRA, M. R. R.; CAMILLO-COURA, L. F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. **Scientia Medica**. Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 113-119, 2010.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. Toxoplasma Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends in parasitology**. v. 37, n. 4, p. 283–295, 2021.
- ARRUDA, C.; MEJÍA, J. A. A.; RIBEIRO, V. P.; BORGES, C. H. G.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus – A review. **Biomed Pharmacother**. [s. l.], v. 109, p. 1-20, 2019.
- BARBOSA, B. F.; LOPES-MARIA, J. B.; GOMES, A. O.; ANGELONI, M. B.; CASTRO, A. S.; FRANCO, P. S.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; IETTA, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. IL10, TGF Beta 1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biology of reproduction**. [s. l.], v. 92, p. 1-13, 2015.
- BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**. [s. l.], v. 35, p. 152-162, 2014.
- BELÁ, S. R. **Avaliação do antígeno SAG2A recombinante de *Toxoplasma gondii* como um potencial marcador diagnóstico para toxoplasmose humana aguda**. Uberlândia, 2007. p. 92. Dissertação (Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.
- BLADER, J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS** [s. l.], v. 117, p. 458-476, 2009.

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

BOLAIS, P. F.; VIGNOLES, P.; PEREIRA, P. F.; KEIM, R.; AROUSSI, A.; ISMAIL, K.; DARDÉ, M. L.; AMENDOEIRA, M. R.; MERCIER, A. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. **Parasites & Vectors**. [s. l.], v. 10, p. 1-8, 2017.

BOTTÓS, J.; MILLER, R. H.; BELFORT, R. N.; MACEDO, A. C.; BELFORT, R. JR.; GRIGG, M. E. Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of *Toxoplasma gondii*. **The British Journal of Ophthalmology**. London, v. 93, n. 11, p. 1546-50, 2009.

BOUGHATTAS, S.; ABDALLAH, R. B.; SIALA, E.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia. **The New Microbiológica**. Pavia, v. 34, n. 4, p. 413-6, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Toxoplasmose. *In*: Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso. 8ed. Brasília: Ministério da Saúde. p. 394-397. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Gestação de alto risco: manual técnico. 5ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. p. 115-118, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Atenção ao pré-natal de baixo risco. Cadernos de Atenção Básica, nº 32. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada—manual técnico. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. p. 11; 18; 24; 106-109.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo de Notificação e Investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. p. 4-28.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. D.; KASPER, L. H. Mucosal deferences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infection. **Cellular microbiology**. [s. l.], v. 8, p. 535-544, 2006.

CAMILO, L. M. **Diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática**: um estudo retrospectivo e prospectivo de 9 anos num laboratório de referência no Estado de São Paulo. 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade antihelmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. [s. l.], v. 7, p. 97-106, 2005.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**. [s. l.], v. 121, p. 55-70, 2012.

CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**. [s. l.], v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**. [s. l.], v. 81, p. 111-122, 2002.

CARRUTHERS, V. B. Proteolysis and toxoplasma invasion. **International Journal for Parasitology**. [s. l.], v. 36, p. 595-600, 2006.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the Chemical Composition of Oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**. [s. l.], v. 55, p. 773-778, 2000.

CASTRO-FILICE, L. S.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILA, N. M.; GOMES, A. O.; ALVES, C. M. O. S.; SILVA, D. A. O.; MARTINS-FILHOS, O. A.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **Journal of translational medicine**. [s. l.], v. 12, 2014.

CESBRON-DELAUW, M. F, GENDRIN C., TRAVIER L., MERCIER, P. R. C. Apicomplexa in Mammalian Cells: Trafficking to the Parasitophorous Vacuole. **Traffic**. [s. l.], v. 9, p. 657–664, 2008.

CHALLIS, J. R.; LOCKWOOD, C. J.; MYATT, L.; NORMAN, J. E.; STRAUSS III, J. F.; PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. **Reproductive Sciences**. [s. l.], v. 16, p. 206-215, 2009.

CORREIA, V. C. S.; LIMA, N. O.; OLIVEIRA, F. A. S.; SANTOS, A. P. A.; TELES, C. B. G.; JÚNIOR, W. P. O.; PIMENTA, R. S. Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [s. l.], v. 49, p. 586-592, 2016.

COSTA, I. N.; RIBEIRO, M.; SILVA, F. P.; DA SILVA, R. J.; DE ARAÚJO, T. E.; MILIÁN, I. C. B.; LUZ, L. C.; GUIRELLI, P. M.; NAKAZATO, G., MINEO, J. R.; MINEO, T.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V. Biogenic Silver Nanoparticles Can Control *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Front Microbiol**. [s. l.], 2021.

CRAVEIRO, A. A.; MAIA, J. G. S.; VAREJÃO, M. J. C.; FILHO, W. W.; MOURÃO, A. P.; ALENCAR, J. W. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amaz**. [s. l.], v. 8, p. 705-706, 1978

DAMASCENO, J. L.; ARNET, Y. F.; FORTUNATO, G. C.; GIROTTO, L.; MARENA, G. D.; ROCHA, B. P.; RESENDE, F. A.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G. Investigation of Safety Profile of Four *Copaifera* Species and of Kaurenoic Acid by Salmonella/Microsome Test. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. [s. l.], v. 2019, p. 1-9, 2019.

DA SILVA, R. J.; GOMES, A. O.; FRANCO, P. S.; PEREIRA, A. S.; MILIAN, I. C. B.; RIBEIRO, M.; FIORENZANI, P.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; DA SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V.; DE FREITAS, B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. **Front Cell Infect Microbiol**. [s. l.], v. 7, p. 1-21, 2017.



DE SOUZA, G. A. G.; DA SILVA, N. C.; DE SOUZA, J.; DE OLIVEIRA, K. R. M.; FONSECA, A. L.; BARATTO, L. C.; OLIVEIRA, E. C. P.; VAROTTI, F. P.; MORAES, W. P. In vitro and in vivo antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. **Phytomedicine**. [s. l.], v. 24, p. 111-118, 2016.

DOS SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; DA VEIGAS-JÚNIOR, V. F.; DE SOUZA, L. M. M.; NAKAMURA, C. V. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental parasitology**. [s. l.], v. 129, p. 145-151, 2011.

DOS SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHOS, B. P.; DA VEIGA JUNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. [s. l.], v. 2012, p. 1-7, 2012.

DUBEY, J. P.; HOETA, I.; OLARIU, T. T.; JONES, J. L.; DARABUS, G. Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. **Parasitology**. [s. l.], v. 141, p. 311-225, 2014.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C. JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. [s. l.], v. 139, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. **Parasites & Vectors**. [s. l.], v. 3, 2010.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **The Lancet**. [s. l.], v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, 1999.

EMELIA, O.; RAHANA, A. R.; MOHAMAD FIRDAUS, A.; CHENG, H. S.; NURSYAIRAH, M. S.; FATINAH, A. S.; AZMAWATI, M. N.; SITI, N. A.; AISAH, M. Y. IgG avidity assay: a tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. **Tropical biomedicine**, [s. l.], v. 31, p. 633-640, 2014.

FALLAHI, S.; ROSTAMI, A.; NOUROLLAHPOUR SHIADEH, M.; BEHNIAFAR, H.; PAKTINAT, S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**. [s. l.], v. 47, p. 133-140, 2018.

FERREIRA, L. A. **Potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*): um estudo de caso na Floresta Estadual do Antimary, Acre**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; BRITO, D. I. V.; BRAGA, F. B. M.; LEITE, N. F.; LUCENA, B. F. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; GOMEZ, M. C. V.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. [s. l.], v. 35, p. 149-154, 2014.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Instituto Superiore di Sanità**. Roma, v. 40, p. 71-80, 2004.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 18, 2011.

FITZGERALD, J. S.; POEHLMANN, T. G.; SCHLEUSSNER, E.; MARKET, U. R. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Human Reproduction Update**. [s. l.], v. 14, p. 335-344, 2008.

FURTADO, R. A.; OLIVEIRA, P. F.; SENEDESE, J. M.; OZELIN, S. D.; SOUZA, L. D. R.; LEANDRO, L. F.; OLIVEIRA, W. L.; SILVA, J. J. M.; OLIVEIRA, L. C.; ROGEZ, H.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six *Copaifera* species for prediction of potential human risks. **Jornal Ethopharmacol.** [s. l.], v. 221, p. 119-125, 2018.

GARCIA-MERIC, P.; FRANCK, J.; DUMON, H.; PIARROUX, R. Management of congenital toxoplasmosis in France. **La Presse médicale**. [s. l.], v. 39, p. 530-538, 2010.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon  $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA., v. 90, p. 6115- 6119, 1993.

GAZZINELLI R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Jornal Immunology**. [s. l.], v. 153, p. 2533-2543, 1994.

GOMES, T. B.; BANDEIRA, F. P. S. F. Uso e diversidade de plantas em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Botânica Brasilica**, [s. l.], v. 26, p. 796-809, 2012.

GONTIJO DA SILVA, M.; CLARE VINAUD, M.; DE CASTRO, A.M. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **PLoS One.**, v.10, e0141700, 2015.

GONÇALVES, E. S. **Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Pós -graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), p. 140, 2014.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A. C.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência e Saúde Coletiva**. [s. l.], v. 3, p. 97-102, 1998.

GRECCO, S. S.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M. J. P.; FPAVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Isolation of an Antileishmanial and Antitrypanosomal Flavanone From the Leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Parasitology Research**. [s. l.], v. 106, p. 1245-1248, 2010.

HADDAD, M.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E. Curcuma as a parasiticidal agent: a review. **Planta Medica**. [s. l.], v. 77, p. 672-8, 2011.

HALL, C. I.; REESE, M. L.; WEERAPANAB, E.; CHILDC, M. A.; BOWYER, P. W.; ALBROW, V. E.; HARALDSEND, J. D.; PHILLIPS, M. R.; SANDOVAL, E. D. S.; WARDD, G. E.; CRAVATT, B. F.; BOOTHROYDA, J. C.; BOGYO, M. Chemical genetic screen identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a regulator of parasite secretion, attachment, and invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s. l.], v. 108, p. 10568-10573, 2011.

HOET, S.; OPPERDOES, F.; BRUN, R.; QUETIN-LECLERCQ, J. Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. **Natural Product Reports**. [s. l.], v. 21, p. 353-64, 2004.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**. [s. l.], v. 10, p. 766-778, 2012.

IMAM, A.; AL-ANZI, F. G.; AL-GHASHAM, M. A.; AL-SURAIKH, M. A.; AL-YAHYA, A. O.; RASHEED, Z. Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection among cancer patients. A prospective study from Qassim region, Saudi Arabia. **Saudi Medical Journal**. [s. l.], v. 38, n. 3, p. 319-321, 2017.

IZUMIL, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Toxicity of Oleoresins from the Genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: A Comparative Study. **Planta Medica**. [s. l.], v. 79, p. 952–958, 2013

IZUMIL, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of medicinal chemistry**. [s. l.], v. 55, p. 2994-3001, 2012.

JEFFERS, V.; TAMPAKI, Z.; KIM, K.; SULLIVAN, W.J. Jr. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. [s. l.], v. 75, p. 2355-2373, 2018.

JIMENEZ-RUIZ, E.; Morlon-Guyot, J.; Daher, W.; Meissner, M. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**. [s. l.], v. 209, p. 18-25, 2016.

JONES, J.; LOPES, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **American Family Physician**. [s. l.], v. 67, p. 2131-2138, 2003.

KADRI, D.; CRATER, A. K.; LEE, H.; SOLOMON, V. R.; ANANVORANICH, S. The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental Parasitology**. [s. l.], v. 145, p. 135-144, 2014.

KAWAZOE, U.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 12ed. São Paulo: Atheneu, Cap.18, p. 163-172, 2011.

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**. Oxford, v. 41, n°6, p. 645–655, 2011.

KIEFFER, F.; WALLON, M. Congenital toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**. [s. l.], v. 112, p. 1099- 1101, 2013.

LEESOMBUN, A.; BOONMASAWAI, S.; SHIMODA, N.; NISHIKAWA, Y. Effects of extracts from Thai Piperaceae plants against infection with *Toxoplasma gondii*. **PLoS ONE**. [s. l.], v. 11, n. 5, e0156116, 2016.

LEITE, A. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**. Rio Branco: Universidade Federal do Acre. 2001.

LI, X-L.; WEI, H-X.; ZHANG, H.; PENG, H-J.; LINDSAY, D. S. A meta analysis on risk of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. **PloS ONE**. [s. l.], v. 9, 2014.

LLOYD, J. U.; CINCINNATI, O. *Copaifera officinalis*. **Western Journal of Medicine**, 1998.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 11, n. 4, p. 407-413, 2009.

MADY, R. F.; EI-HADIDY, W.; ELACHY, S. Effect of *Nigella sativa* oil on experimental toxoplasmosis. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, p. 379-9, 2016.

MARQUES, B. A. Revisão sistemática dos métodos sorológicos utilizados em gestantes nos programas de triagem diagnóstica pré-natal da toxoplasmose. **Rev Med**. Minas Gerais, 2015.

MCLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. [s. l.], v. 104, p. 320344, 2009.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEJI, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**. [s. l.], v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011a.

MENECEUR, P.; BOULDOUYRE, M. A.; AUBERT, D.; VILLENA, I. MENOTTI, J.; SAUVAGE, V. GARIN, J. F.; DEROUIN, G. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. [s. l.], v. 52, p. 1269–1277, 2008.

MERCIER, C.; ADJOGLE, K. D.; DAUBENER, W.; DELAUW, M. F. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International Journal for Parasitology**. [s. l.], v. 35, p. 829-849, 2005.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. [s. l.], v. 39, p. 23-29, 2009.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F. M. R.; NAVARRO, I. T. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: EDUEL, 2010.

MONTAZERI, M.; MEHRZADI, S.; SHARIF, M.; SARVI, S. TANZIFI, A.; AGHAYAN, S. A.; DARYANI, A. Drug resistance in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Microbioly**. [s. l.], v. 9, 2018.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. [s. l.], v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**. [s. l.], v. 47, p. 554–566, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. [s. l.], v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHOPADHYAY, D.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. [s. l.], v. 10, 2020.

MUKHOPADHYAY, D.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J. Toxoplasma GRA15 and GRA24 are important activators of the host innate immune response in the absence of TLR11. **PLoS pathogens**. [s. l.], v. 16, n. 5, e1008586, 2020.

MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. Assays to Evaluate Toxoplasma-Macrophage Interactions. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s. l.], v. 2071, p. 347–370, 2020.

NASR, I. A.; AHMED, F.; PULLISHERY, F.; EL-ASHRAM, S.; RAMAIAH, V. V. Toxoplasmosis and anti-Toxoplasma effects of medicinal plant extracts - A mini-review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. [s. l.], v. 9, n. 8, p. 730-734, 2016.

NAST, R.; CHOEPAK, T.; LÜDER, C. Epigenetic Control of IFN- $\gamma$  Host Responses During Infection With *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in immunology**, 11, 581241, 2020.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2004.

OLARIU, T. R.; REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; ALAM, A.; MONTOYA, J. G. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. [s. l.], v. 30, p. 1056-1061, 2011.

OLIVEIRA, C. B. S. **Avaliação das atividades anti-toxoplásmica, antioxidante e antiinflamatória dos monoterpenos Timol (*Lippia sidoides*) e Estragol (*Croton zenhtneri*)**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

OLIVEIRA, T. C. **Avaliação dos efeitos in vitro e in vivo do extrato total de *Artemisia annua* L. no controle da infecção aguda por *Toxoplasma gondii***. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

OZ, H. S. Novel synergistic protective efficacy of atovaquone and diclazuril on fetal-maternal toxoplasmosis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. [s. l.], v. 5, p. 921-932, 2014a.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 214-223, 2007.

PETERS, P. J.; THIQPEN, M. C.; PARISE, M. E.; NEWMAN, R. D. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. **Drug Safety**. [s. l.], v. 30, n. 6, p. 481-501, 2007.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of na indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon um cultured human fibroblasts. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. [s. l.], v. 6, p. 267-279, 1986.

PIERI, F. A. I.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. I. Copaiba oil (*Copaifera* sp.): history, extraction, industrial applications and medicinal properties. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. [s. l.], v. 11, p. 465-472, 2009.

PRADO, A. A. F.; ALMEIDA, G. F.; GONTIJO, L. S.; TORRES, M. L. M. Toxoplasmose: O que o profissional da saúde deve saber. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-30, 2011.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J. P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**. Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 359-68, 2012.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, [s. l.], v. 39, p. 603-613, 2001.

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

RIBEIRO, M.; FRANCO, P. S.; LOPES-MARIA, J. B., ANGELONI, M. B; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; CASTRO, A. S.; DA SILVA, R. J.; OLIVEIRA, F. C.; MILIAN, I. C. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; IETTA, F.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. **Exp Parasitol**. [s. l.], 2017.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**. [s. l.], v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. *In: BRASIL. Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Ministério da Saúde, 2012.

RODRIGUES, I. A.; RAMOS, A. S.; FALCÃO, D. Q.; FERREIRA, J. L. P.; BASSO, S. L.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F. Development of Nanoemulsions to Enhance the Antileishmanial Activity of *Copaifera paupera* Oleoresins. **BioMed Research International**. 2018.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I. BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**. [s. l.], v. 21, p. 458-72, 2006.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25 + CD4 + regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**. [s. l.], v. 6, p. 345-352, 2005.

SANTOS, A. O.; SARVIL, S.; PAGHEH S. A.; ASFARAM, S.; RAHIMI, M. T.; MEHRZADI, S.; AHMADPOUR, E.; GHOLAMI, S.; DARYANI, A. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**. [s. l.], v. 120, p. 204-208, 2008.

SEPULVEDA-ARIS, J. C.; VELOZA, L. A.; MANTILLA-MURIEL, L. E. Anti-Toxoplasma activity of natural products: a review. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**. [s. l.], v. 9, p. 186-194, 2014.

SHARIF, M.; *et al.* The efficacy of herbal medicines against *Toxoplasma gondii* during the last 3 decades: a systematic review. **Canadian journal of physiology and pharmacology**. [s. l.], v. 94, p. 1237-1248, 2016.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **The Royal Society**. [s. l.], v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, J. J. M.; CREVELIN, E.J.; CARNEIRO, L. J.; ROGEZ, H.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; MORAES, L. A. B.; BASTOS, J. K. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. **Journal of Chromatography A**. [s. l.], 2017.

SILVA, L. A.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; VITOR, R. W. Genetic polymorphisms and phenotypic profiles of sulfadiazine resistant and sensitive *Toxoplasma gondii* Isolates obtained from newborns with congenital toxoplasmosis in minas gerais Brazil. **PLoS ONE**. [s. l.], v. 12, e0170689, 2017.

SOUZA, W.; DUARTE, E.S.M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**. [s. l.], v. 20, p. 131-143, 2010.

STRANG, A. G. G. F.; FERRARI, R. G.; DO ROSÁRIO, D. K.; NISHI, L, EVANGELISTA, F. F.; SANTANA, P. L.; DE SOUZA, A. H.; MANTELO, F. M.; GUILHERME, A. L. F. The congenital toxoplasmosis burden in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Acta Trop**. [s. l.], v. 211, 105608, 2020.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; ZHU, X. Q.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 109, n. 15, p. 5844-9, 2012.

TEIXEIRA, S. C.; DE SOUZA, G.; BORGES, B. C.; ARAÚJO, T. E., ROSINI, A. M. AGUILA, F. A.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. J. B.; MARTINS, C. H. G.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V. *Copaifera* spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Scientific Reports**. Uberlândia, v. 10, p. 15158, 2020.

TEIXEIRA, S. C.; DE SOUZA, G.; ROSINI, A. M.; ARAÚJO, T. E.; LUZ, L. C. **Potencial terapêutico de compostos bioativos isolados de *Copaifera* spp. no tratamento da doença de chagas, leishmaniose e malária.** In: Ciências médicas na Amazônia. Rio Branco: Stricto Sensu, 2020. p. 317-328.

TEIMOURI, A.; MOHTASEBI, S.; KAZEMIRAD, E., KESHAVARZ, H. Role of *Toxoplasma gondii* IgG Avidity Testing in Discriminating between Acute and Chronic Toxoplasmosis in Pregnancy. **J Clin Microbiol**. [s. l.], v. 24;58(9):e00505-20, 2020.

TONINI, M. L. Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade leishmanicida de compostos utilizando *Leishmania amazonensis* expressando a enzima beta-galactosidase. Florianópolis, 2013. 199p. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências). Universidade Federal de Santa Catarina

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bull World Health Organ**. [s. l.], v. 91, p. 501-508, 2013.

TRINDADE, R.; SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, p. 1-33, 2018.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera*. L. **Química Nova**. [s. l.], v. 25, n. 2, p. 273-86, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. [s. l.], v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENUGOPAL, K.; MARION, S. Secretory organelle trafficking in *Toxoplasma gondii*: A long story for a short travel. **International Journal of Microbiology**. [s. l.], v. 308, n. 7, p. 751-760, 2018.

VIEIRA, R. G. L. In vitro studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrob. Resist. Infect. Control**. [s. l.], v. 7, n. 14, 2018.

WEATHERS, P.; TOWLER, M.; HASSANALI, A.; LUTGEN, P.; ENGEU, P. O. Dried-leaf *Artemisia annua*: A practical malaria therapeutic for developing countries? **World Journal of Pharmacology**. [s. l.], v. 3, n. 4, p. 39-55, 2014.



WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; STRIEPEN, B.; ROOS, D. S.; HUNTER, C.A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**. [s. l.], v. 23, p. 291-296, 2001.

WOLFE, M. W. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. **Methods in Molecular Medicine**. [s. l.], v. 121, p. 229-239, 2006.

YAN, CHAO.; LIANG, L. J.; ZHENG, K. Y.; ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasite & Vectors**. [s. l.], v. 9, n. 137, p. 1-7, 2016.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**. [s. l.], v. 14, n. 2, p. 109-121, 2014.

YAROVINSKY, F.; HIENY, S.; SHER, A. Recognition of *Toxoplasma gondii* by TLR11 prevents parasite-induced immunopathology. **Journal Immunology**. [s. l.], v. 181, n. 12, p. 8478-8484, 2008.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**. [s. l.], v. 308, n. 5728, p. 1626-1629, 2005.

ZHENG, B.; DING, J.; LOU, D.; TONG, Q.; ZHUO, X.; DING, H.; KONG, Q.; LU, S. The Virulence-Related MYR1 Protein of *Toxoplasma gondii* as a Novel DNA Vaccine Against Toxoplasmosis in Mice. **Frontiers in microbiology**. [s. l.], v. 10, p. 734, 2019.

## ANEXO I



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

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

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

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

e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br) ; [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS  
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

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

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

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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